

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年1 月22 日 (22.01.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/006956 A1

(51) 国際特許分類⁷: A61K 45/00, 31/454, 31/53, 31/381,
A61P 25/00, 43/00, 43/00 // C07D 401/06, 333/68

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/008904

(22) 国際出願日: 2003 年7 月14 日 (14.07.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-204725 2002 年7 月12 日 (12.07.2002) JP
特願2003-8230 2003 年1 月16 日 (16.01.2003) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立
行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND

TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉
県 川口市 本町四丁目 1 番 8 号 Saitama (JP). 財団法人
大阪バイオサイエンス研究所 (OSAKA BIOSCIENCE
INSTITUTE) [JP/JP]; 〒565-0874 大阪府 吹田市 古
江台 6 丁目 2 番 4 号 Osaka (JP). 大國薬品工業株式
会社 (TAIHO PHARMACEUTICAL CO. LTD.)
[JP/JP]; 〒101-8444 東京都 千代田区 神田錦町 1-27
Tokyo (JP). 塩野義製薬株式会社 (SHIONOGI & CO.,
LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府 大阪市 中央区道修
町 3 丁目 1 番 8 号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 裏出 良
博. (URADE, Yoshihiro) [JP/JP]; 〒606-0804 京都
府 京都市 左京区下鴨松原町 4 3 グラン・シ
ティオ下鴨四季彩館 5 0 3 Kyoto (JP). 江口 直美
(EGUCHI, Naomi) [JP/JP]; 〒565-0821 大阪府 吹田

[続葉有]

(54) Title: DRUGS FOR IMPROVING THE PROGNOSIS OF BRAIN INJURY AND A METHOD OF SCREENING THE SAME

(54) 発明の名称: 脳損傷の予後改善薬とそのスクリーニング方法

(57) Abstract: It is intended to provide a compound for treating or preventing brain injury such as cerebrovascular disorder, brain degenerative disease or demyelinating disease and a method of screening the same. Brain injury (for example, cerebrovascular disorder, brain degenerative disease or demyelinating disease) in which prostaglandin D₂ participates is treated or prevented by inhibiting hematopoietic prostaglandin D synthase induced in microglial cells or macrophages in the injured site or inhibiting the activation of prostaglandin D receptor expressed in astroglial cells around the injured site. It is also intended to provide a method of testing such a pharmaceutically active substance with the use of a transgenic mouse which shows overexpression of human hematopoietic prostaglandin D synthase.

(57) 要約:

脳血管障害、脳変性疾患、脱髄疾患等の疾患による脳損傷を治療または予防する化合物と、そのスクリーニング方法を提供する。

脳血管障害、脳変性疾患、脱髄疾患等の疾患による脳損傷の局所のミクログリア細胞やマクロファージにおいて誘導される造血器型プロスタグランジンD合成酵素を阻害したり、損傷部位の周辺のアストログリア細胞で発現するプロスタグランジンD受容体の活性化を阻害することにより、プロスタグランジンD₂が関与する脳損傷を治療または予防する。さらに、ヒト造血器型プロスタグランジンD合成酵素大量発現トランスジェニックマウスを用いて、これらの薬効物質を試験する方法も提供する。

WO 2004/006956 A1

BEST AVAILABLE COPY



市 山田東 4-8-3-307 Osaka (JP). 有竹 浩介 (ARITAKE, Kosuke) [JP/JP]; 〒666-0143 兵庫県 川西市 清和台西 1-5-20 清和台ハイム 1号棟 133号 Hyogo (JP). 佐藤 陽 (SATO, Yo) [JP/JP]; 〒562-0031 大阪府 箕面市 小野原東 4-13-18 ワイズ参番館 203 Osaka (JP). 角山 圭一 (KADOYAMA, Kei-ichi) [JP/JP]; 〒565-0821 大阪府 吹田市 山田東 4-37-38 サンコーポ 301号 Osaka (JP). 谷池 雅子 (TANIKE, Masako) [JP/JP]; 〒664-0014 兵庫県 伊丹市 広畑 4丁目 33番地 Hyogo (JP).

(74) 代理人: 河宮 治, 外 (KAWAMIYA, Osamu et al.); 〒540-0001 大阪府 大阪市 中央区城見 1丁目 3番 7号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,

LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

脳損傷の予後改善薬とそのスクリーニング方法

5 技術分野

この発明は、脳損傷を治療または予防する化合物及びそのスクリーニング方法に関するものである。さらに詳しくは、この発明は、脳血管障害、脳変性疾患、脱髄疾患等の疾患による脳損傷部位のミクログリア細胞やマクロファージにおいて誘導される造血器型プロスタグランジンD合成酵素（以下、「H-PGDS」ということがある）を阻害したり、損傷部位の周辺のアストログリア細胞で発現するプロスタグランジンD受容体（以下、「DP受容体」ということがある）の活性化を阻害することにより、プロスタグランジンD₂が関与する脳損傷を治療または予防する化合物と、これらの物質の薬効を、ヒト造血器型プロスタグランジンD合成酵素大量発現トランスジェニックマウスを用いて試験する方法に関するものである。

背景技術

医療技術の発達により、頭部に大規模な損傷を負っても一命を取り留める人が増えている。交通事故や、労働中の災害、スポーツなどにより頭部外傷を負う人は多く、実に交通事故で死亡する人の半数は頭部外傷が原因である。これらは頭蓋骨に外力がかかった際、直下に生じる脳挫傷、あるいは脳浮腫に起因している。脳浮腫とは、脳血管に存在する脳血液関門の破綻が原因であり、血漿成分が血管外に漏出して脳が腫れてくることである。近年この治療法として、低体温法が注目されているが、これは脳代謝を抑えることで脳浮腫の増悪や頭蓋内圧の上昇を抑制し、二次的な脳損傷を防ごうとする治療方法である。重要な治療方針ではあるが、しかし、低体温による心肺機能や免疫機構の低下による問題が生じる場合もある（N. Engl. J. Med., 2001; 344:556-563）。

発明の開示

本発明は脳の局所的な炎症の遷延による組織損傷を抑止し、予後の改善をはか

ることのできる化合物を提供することを目的とする。

本発明はまたそのような化合物をスクリーニングする方法を提供することも目的とする

上記目的を達成するため本発明者は鋭意研究を行ない、次のような知見を得た
5 ことに基いて本発明を完成させた。

1) 遺伝性であるか外傷性であるかを問わず脳損傷が生じた場合、H-PGDS
及びDP受容体の発現が増加する。

2) H-PGDSは脳損傷の局所のミクログリア細胞やマクロファージにおいて、
DP受容体は損傷部位の周辺のアストログリア細胞で発現が誘導される。

10 3) 損傷部位ではマクロファージの集積、アストログリア細胞の活性化が顕著で
ある。

4) H-PGDSの阻害剤又はDP受容体の拮抗剤を投与するとDP受容体の発
現が減少し、アストログリア細胞の活性化が抑制される。

15 5) H-PGDS大量発現トランスジェニックマウスでは野性型マウスに比べ脳
損傷が増悪される。

6) H-PGDS遺伝子欠損マウスとDP受容体欠損マウスでは野性型マウスに
比べ損傷部位での出血やアストログリア細胞の活性化が軽微である。

即ち、本発明は、造血器型プロスタグランジンD合成酵素（H-PGDS）阻
害剤を活性成分として含む、脳損傷の治療または予防に用いる医薬組成物を要旨
20 とする。

「脳損傷」には交通事故等による外傷性のものに止まらず、脳梗塞や脳出血等
の脳血管障害によるもの、アルツハイマー病、多発性硬化症等を含む脳変性疾患、
脱髄疾患等も含む。「脳損傷の治療または予防」とは、脳挫傷、脳浮腫、脳梗塞、
脳出血、虚血性脳症、アルツハイマー病、多発性硬化症、脱髄疾患の治療または
25 予防を包含する

本発明は、プロスタグランジンD受容体の拮抗薬を有効成分として含む、脳損
傷の治療または予防に用いる医薬組成物をも要旨とする。

本発明は、有効量の造血器型プロスタグランジンD合成酵素（H-PGDS）
阻害剤を投与することを含む脳損傷の治療方法をも要旨とする。

本発明は、脳損傷の治療用薬剤を製造するための、造血器型プロスタグランジンD合成酵素（H-PGDS）阻害剤の使用をも要旨とする。

本発明は、有効量のプロスタグランジンD受容体の拮抗薬を投与することを含む脳損傷の治療方法をも要旨とする。

5 本発明は、脳損傷の治療用薬剤を製造するための、プロスタグランジンD受容体の拮抗薬の使用をも要旨とする

本発明は、造血器型プロスタグランジンD合成酵素（H-PGDS）阻害剤およびプロスタグランジンD受容体の拮抗薬を活性成分として含む、脳損傷の治療または予防に用いる医薬組成物をも要旨とする。

10 本発明は、1) ヒトH-PGDS大量発現トランスジェニックマウスの脳に外傷を与え、

2) 外傷を与える前又は後に候補化合物をトランスジェニックマウスに投与し、

3) 該マウスにおける外傷の状態を、候補化合物を与えないトランスジェニックマウスにおける状態と比較する、

15 ことを含む脳損傷の治療または予防に用いる化合物のスクリーニング方法をも要旨とする。

図面の簡単な説明

20 図1は、Twitcherマウスの大脳と小脳におけるH-PGDSおよびDP受容体mRNAの発現レベルの変化を示すグラフである。

図2は、免疫組織染色法によるTwitcherマウスのミクログリア細胞やマクロファージ細胞に局在しているH-PGDSを示す模写図である。

図3は、活性化アストログリア細胞に発現したDP受容体を示す模写図である。

25 図4は、実験的自己免疫性脳脊髄炎マウスにおけるH-PGDSおよびDP受容体mRNAの発現レベルの変化を示すグラフである。

図5は、実験的自己免疫性脳脊髄炎マウスでのH-PGDS発現レベルの変化を示す模写図である。

図6は、外傷性脳損傷モデルでのH-PGDSのmRNA発現量の経時変化を示すグラフである。

図 7 は、外傷性脳損傷モデルでの DP 受容体の mRNA 発現量の経時変化を示すグラフである。

図 8 は、外傷性脳損傷モデルでの炎症の経時変化を示す模写図である。

図 9 は、外傷性脳損傷モデルにおける H-PGDS 発現の経時変化を示す模写図である。

図 10 は、外傷性脳損傷モデルにおけるアストログリア細胞の活性化の経時変化を示す模写図である。

図 11 は、外傷性脳損傷周辺の活性化アストログリア細胞での DP 受容体の発現を示す模写図である。

図 12 は、外傷性脳損傷から 4 日後の野生型マウスとヒト H-PGDS 大量発現トランスジェニックマウスの脳損傷の比較を示す模写図である。

図 13 は、Twitcher マウスでの HQL-79 によるアストログリア細胞の活性化と DP 受容体発現の抑制を示す模写図である。

図 14 は、外傷性脳損傷後の DP 受容体発現に対する HQL-79 の抑制効果を示すグラフである。

図 15 は、外傷性脳損傷に対する HQL-79 の回復促進効果を示す模写図である。

図 16 は、外傷性脳損傷に対する DP 受容体拮抗薬の回復促進効果を示す模写図である。

図 17 は、外傷性脳損傷から 4 日後の野生型マウスと H-PGDS 遺伝子欠損マウスの脳損傷の比較を示す模写図である。

図 18 は、トランスジェニックマウスの作製に用いた導入ベクターの構造を示す図である。

図 19 は、マウス H-PGDS 遺伝子の構造（上段）、ターゲティングベクターにおける変異配列の構造（中段）および相同組換え後のマウスゲノム DNA（下段）を示す図である。

図 20 は、外傷性脳損傷モデルでの炎症の経時変化を組織へのエバンスブルー色素漏出反応を指標に調べた結果を示すグラフである。

図 21 は、外傷性脳損傷後の組織傷害（色素漏出）に対する HQL-79 の抑

制効果を示すグラフである（傷害を与える1時間前からHQL-79の投与を開始した）。

図22は外傷性脳損傷後の組織傷害（色素漏出）に対するHQL-79の抑制効果を示す模写図である（傷害を与えた1日後からHQL-79の投与を開始した）。

図23は外傷性脳損傷後の組織傷害（色素漏出）に対するHQL-79の抑制効果を示すグラフである（傷害を与えた1日後からHQL-79の投与を開始した）。

図24は外傷性脳損傷に伴うエバンスブルー色素の漏出に対するピナグランジンの抑制効果を示すグラフである。

図25は、外傷性脳損傷に対するピナグランジンの進展抑制効果を示す模写図である。

図26は外傷性脳損傷から2日後の野生型マウスとHPGDS KOあるいはDPR KOマウスの脳損傷を傷害部位への色素漏出を指標に比較したグラフである。

図27は外傷性脳損傷後の組織傷害（色素漏出）に対するBWA 868Cおよびラマトロバンの抑制効果を示すグラフである。

発明の詳細な記述

H-PGDS阻害剤の例は、4-ベンズヒドリルオキシ-1-（3-（1H-テトラゾール-5-イル）-プロピル）-ピペリジン（HQL-79）、1-アミノ-4-（4-〔4-クロロ-6-（2-スルホフェニルアミノ）-〔1, 3, 5〕トリアジン-2-イルメチル〕-3-スルホフェニルアミノ）-9, 10-ジオキソ-9, 10-ジヒドロ-アントラセン-2-スルホン酸（チバクロンブルー）、1-アミノ-4-（4-スルファモイルアニリノ）-アントラキノ-2-スルホン酸（PGD-042）もしくはその製薬上許容される塩またはそれらの水和物、2-（2'-ベンゾチアゾリル）-5-スチリル-3-（4'-フタルヒドラジディル）テトラゾリウム塩化物（PGD-016）またはそれらの水和物を含む。

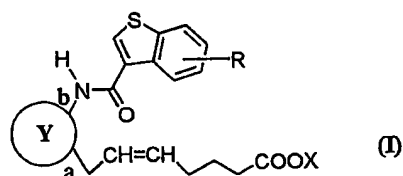
本明細書中、「製薬上許容される塩」とは、塩基性塩として、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩；カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩；アンモニウム塩；トリメチルアミン塩、トリエチルアミン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、エタノールアミン塩、ジエタノールアミン塩、トリエタノールアミン塩、プロカイン塩等の脂肪族アミン塩；N，N-ジベンジルエチレンジアミン等のアラルキルアミン塩；ピリジン塩、ピコリン塩、キノリン塩、イソキノリン塩等のヘテロ環芳香族アミン塩；テトラメチルアンモニウム塩、テトラエチルアモニウム塩、ベンジルトリメチルアンモニウム塩、ベンジルトリエチルアンモニウム塩、ベンジルトリブチルアンモニウム塩、メチルトリオクチルアンモニウム塩、テトラブチルアンモニウム塩等の第4級アンモニウム塩；アルギニン塩、リジン塩等の塩基性アミノ酸塩等が挙げられる。酸性塩としては、例えば、塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩、炭酸塩、炭酸水素塩、過塩素酸塩等の無機酸塩；酢酸塩、プロピオン酸塩、乳酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、酒石酸塩、リンゴ酸塩、クエン酸塩、アスコルビン酸塩等の有機酸塩；メタンスルホン酸塩、イセチオン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩等のスルホン酸塩；アスパラギン酸塩、グルタミン酸塩等の酸性アミノ酸等が挙げられる。これらの塩は、通常行われる方法によって形成させることができる。水和物を形成する時は、任意の数の水分子と配位していてもよい。

本発明はまた、プロスタグランジンD受容体の拮抗薬を活性成分として含む、脳損傷の治療または予防に用いる医薬組成物をも要旨とする。

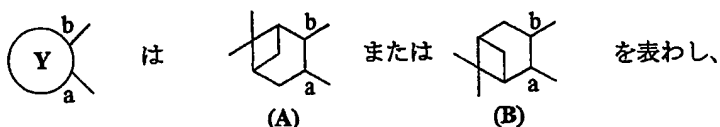
プロスタグランジンD受容体の拮抗薬の例は、(±)-3-ベンジル-5-(6-カルボキシヘキシル)-1-(2-シクロヘキシル-2-ヒドロキシエチルアミノ)-ヒダントイン (BW A 8 6 8 C)、(+)-3-(4-フルオロベンゼンスルホンアミド)-1, 2, 3, 4-テトラヒドロカルバゾール-9-プロピオン酸 (ラマトロバン)、(Z)-7-[(1R, 2R, 3S, 5S)-2-(5-ヒドロキシベンゾ[b]チオフェン-3-イルカルボニルアミノ)-10-ノルピナン-3-イル]ヘプター-5-エン酸、(Z)-7-[(1R, 2R, 3S, 5S)-2-(ベンゾ[b]チオフェン-3-イルカルボニルアミノ)-10-ノルピナン-3-イル]ヘプター-5-エン酸 (ピナグラ

ジン) もしくはその製薬上許容される塩またはそれらの水和物である。

更なるプロスタグランジンD受容体の拮抗薬の例は、式 (I) :



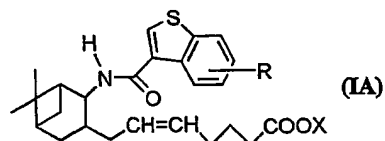
5 (式中、



Rは水素、アルキル、アルコキシ、ハロゲン、ヒドロキシ、アシルオキシまたは置換されていてもよいアリアルスルホニルオキシを表わし、Xは水素またはアルキルを表わし、 α 鎖の二重結合はE配置またはZ配置を表わす)

10 で示される化合物もしくはその製薬上許容される塩またはそれらの水和物を含む。

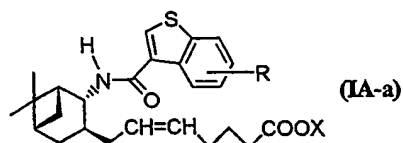
好ましい態様では、プロスタグランジンD受容体の拮抗薬は、式 (I A) :



15 (式中、RおよびXは前記と同意義であり、 α 鎖の二重結合はE配置またはZ配置を表わす)

で示される化合物もしくはその製薬上許容される塩またはそれらの水和物である。

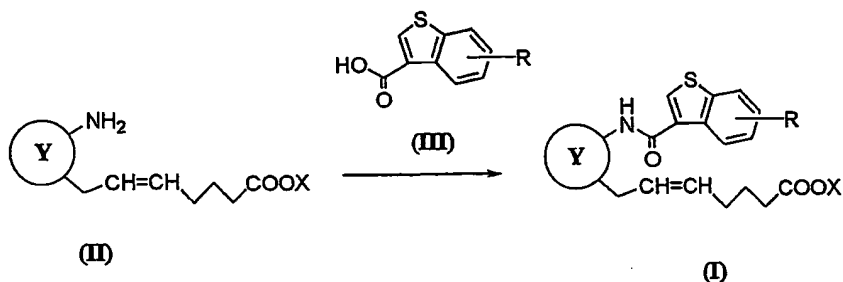
更に、好ましくはプロスタグランジンD受容体の拮抗薬は、式 (I A-a) :



20 (式中、RおよびXは前記と同意義であり、 α 鎖の二重結合はE配置またはZ配

置を表わす)

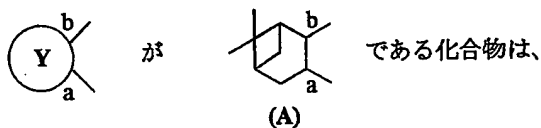
で示される化合物もしくはその製薬上許容される塩またはそれらの水和物である
一般式 (I) で表わされる化合物は公知であり以下のようにして製造できる。



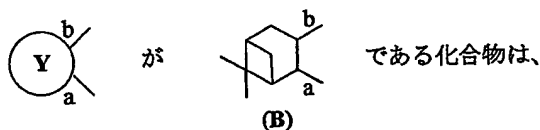
- 5 (式中、Y環、XおよびRは前記と同意義であり、 α 鎖の二重結合はE配置またはZ配置を表わす)

一般式 (I) で示される化合物は、上記反応式で示されるごとく、一般式 (I I I) で示されるアミノ化合物に一般式 (I I I) で示されるカルボン酸またはその反応性誘導体を反応させることにより製造することができる。

- 10 本反応法における原料化合物 (I I) 中、



特公平6-23170号明細書に記載されている。また、



- 15 特開昭61-49号明細書および特開平2-180862号明細書に記載されている。

一般式 (I I I) で示されるカルボン酸とは、4-プロモベンゾ [b] チオフェン-3-カルボン酸、5-プロモベンゾ [b] チオフェン-3-カルボン酸、6-プロモベンゾ [b] チオフェン-3-カルボン酸、7-プロモベンゾ [b] チオフェン-3-カルボン酸、5-フルオロベンゾ [b] チオフェン-3-カルボン酸、6-フルオロベンゾ [b] チオフェン-3-カルボン酸、4-ヒドロキ

シベンゾ [b] チオフェン-3-カルボン酸、5-ヒドロキシベンゾ [b] チオ
フェン-3-カルボン酸、6-ヒドロキシベンゾ [b] チオフェン-3-カルボ
ン酸、7-ヒドロキシベンゾ [b] チオフェン-3-カルボン酸、5-アセトキ
シベンゾ [b] チオフェン-3-カルボン酸、ベンゾ [b] チオフェン-3-カ
5 ルボン酸、5-ベンゾスルホニルオキシベンゾ [b] チオフェン-3-カルボン
酸、5-メチルベンゾ [b] チオフェン-3-カルボン酸、6-メチルベンゾ
[b] チオフェン-3-カルボン酸、5-メトキシベンゾ [b] チオフェン-3
-カルボン酸、6-メトキシベンゾ [b] チオフェン-3-カルボン酸である。
これらのカルボン酸は、それぞれ前記定義の置換基を有することができる。

10 これらのカルボン酸は、日本化学雑誌 88 巻、7 号、758-763 (1967)、
日本化学雑誌 86 巻、10 号、1067-1072 (1965)、J. Chem. Soc (c) 1899-
1905 (1967)、J. Heterocycle. Chem. 10 巻、679-681 (1973)、J. Heterocyclic Chem.
19 巻、1131-1136 (1982)、J. Med. Chem. 29 巻、1637-1643 (1986) 記載の方法に準じ
て合成できるものである。

15 一般式 (I I I) で示されるカルボン酸の反応性誘導体とは、対応する酸ハロ
ゲン化物 (例えば、塩化物、臭化物、沃化物)、酸無水物 (例えば、ぎ酸もしくは
酢酸との混合酸無水物)、活性エステル (例えば、スクシンイミドエステル)
などを意味し、通常アミノ基のアシル化に使用するアシル化剤を包含する。例え
ば、酸ハロゲン化物とするとき、ハロゲン化チオニル (例えば、塩化チオニ
20 ル)、ハロゲン化リン (例えば、三塩化リン、五塩化リン)、ハロゲン化オギザ
リル (例えば、塩化オギザリル) 等と公知の方法 (例えば、新実験化学講座 14 巻
1787 頁 (1978); Synthesis 852-854 (1986); 新実験化学講座 22 巻 115 頁 (1992))
に従って反応させればよい。

25 反応は通常のアミノ基のアシル化反応の条件に従って行えばよく、例えば、酸
ハロゲン化物による縮合反応の場合、溶媒としてエーテル系溶媒 (例えば、ジエ
チルエーテル、テトラヒドロフラン、ジオキサン)、ベンゼン系溶媒 (例えば、
ベンゼン、トルエン、キシレン)、ハロゲン化炭化水素系溶媒 (例えば、ジクロ
ロメタン、ジクロロエタン、クロロホルム)、その他、酢酸エチル、ジメチルホ
ルムアミド、ジメチルスルホキシド、アセトニトリルなどを使用し、要すれば塩

基（例えば、トリエチルアミン、ピリジン、N、N-ジメチルアミノピリジン、
N-メチルモルホリンなどの有機塩基、あるいは水酸化ナトリウム、水酸化カリ
ウム、炭酸カリウムなどの無機塩基）の存在下、冷却下ないし室温あるいは加熱
下、好ましくは-20℃ないし氷冷下あるいは室温ないし反応系の加熱還流温度
5 で、数分ないし数10時間、好ましくは0.5時間ないし24時間、より好まし
くは1時間ないし12時間実施すればよい。また、カルボン酸を反応性誘導体と
はせずに、遊離のまま使用する場合には、アミンとカルボン酸の縮合反応に使用
する縮合剤（例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）、1-エチル
-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド、N、N'-カルボニル
10 ジイミダゾール）の存在下に反応させる。

本発明の医薬組成物は造血器型プロスタグランジンD合成酵素（H-PGDS）
阻害剤およびプロスタグランジンD受容体の拮抗薬の両方を活性成分として
用いてもよい。

15 本発明で使用する脳損傷の治療または予防に用いる化合物は上記のようにH-
PGDS阻害剤又はプロスタグランジンD受容体の拮抗薬から選択することもで
きるが、次のようにしてスクリーニングすることもできる。

すなわち。

- 1) ヒトH-PGDS大量発現トランスジェニックマウスの脳に外傷を与え、
- 20 2) 外傷を与える前又は後に候補化合物を該トランスジェニックマウスに投与し、
- 3) 該マウスにおける外傷の状態を、候補化合物を与えないトランスジェニック
マウスにおける状態と比較する。

ヒトH-PGDS大量発現トランスジェニックマウスの製造方法は2000年
10月5日に出願された国際出願PCT/JP00/06963（WO 01/
25 24627）に開示されている。その全体が本明細書の一部を構成する。

実施例

製造例1

造血器型プロスタグランジンD合成酵素大量発現トランスジェニックマウスの作

製

WO 01/24627号に開示されている方法に従って造血器型プロスタグランジンD合成酵素大量発現トランスジェニックマウスを作製した。

ヒト細胞のmRNAから調製したcDNAライブラリーから、ラットH-PGD
5 DS遺伝子のcDNA (Cell 90:1085-10975, 1997; GenBank Accession No. D82071) をプローブしてヒトH-PGDSのcDNA (Eur. J. Biochem. 267:3315-3322, 2000; GenBank Accession No. NM-014485) をクローニングした。
次にベクターpCAGGS (Gene 108: 193-199 (1991)) のクローニング部位
(S a l I / N o t I) にヒトH-PGDSのcDNAを挿入結合し、導入
10 ベクターを構築した。図18はこの導入ベクターにおける導入遺伝子の構成である。この導入遺伝子はCMVエンハンサーとチキンβ-アクチンプロモーターをH-PGDS cDNAの上流に有しており、マウスの染色体に導入されると、これらのエンハンサーおよびプロモーターの作用によりH-PGDS mRNAを大量に発現される。この導入ベクターをマイクロインジェクション法によりFVB
15 マウス (National Institute of Health Animal Genetic Resourceより入手) の受精卵に注入した。遺伝子導入受精卵は定法に従って仮親の卵管に移植し、個体へと発生させ出生させた。得られたマウスの尾部からDNAを抽出し、導入遺伝子の配列に基き合成されたプローブを用いて、サザンブロット法によりトランスジェニックマウスを選別した。

製造例2

造血器型プロスタグランジンD合成酵素遺伝子欠損 (H-PGDS KO) マウスの作製

2002年1月28日に出願された特願2002-18666号に教示されている方法に従って造血器型プロスタグランジンD合成酵素遺伝子欠損マウスを作
25 製した。

公知のマウスH-PGDS遺伝子のエクソンII (H-PGDSの蛋白質翻訳開始領域) を含む領域をNeor^r 遺伝子に置換し、さらにH-PGDS遺伝子の約7Kb上流にヘルペスウイルスのサイミジンカイネース遺伝子 (HSV-tk 遺伝子) を組み込んで変異配列を調製し、この変異配列をベクターに組み込んで

ターゲティング・ベクターを作製した（図19参照）。

電気穿孔法により、未分化の培養ES細胞（ 1.2×10^7 個）にターゲ
ィング・ベクターを $48 \mu\text{g}/\text{ml}$ の割合で導入して遺伝子導入ES細胞を得た。
これらの細胞をプレートに播き、2日後にG418およびガンシクロビルを培地
5 に添加して更に7日間培養し、G418およびガンシクロビルに耐性を示すコロ
ニーを得た。これらのコロニーを個別に分離し、さらに培養したのち、DNAを
抽出してサザンブロッティングにより相同組換えES細胞を選別した。

次いで、この相同組換えES細胞を、C57BL/6系マウスの胚盤胞へ常法
により注入し、仮親マウスへ移植して個体へと発生させた。

10 その結果、10匹のキメラマウスを得た。得られたキメラマウスのうち、雄の
個体と雌の野生型C57BL/6系マウスとを交配させて初代（ F_1 ）マウスを
得た。これらの F_1 マウスから、サザンロット分析により2倍体染色体の一方
に変異配列が確認された個体（♂、♀）を選別し、これらを交配させて第2世代
（ F_2 ）マウスを得た。

15 最終的に、これら F_2 マウスから、サザンロット分析により2倍体染色体の
両方に変異配列が確認された個体（ホモ接合体）および片方に変異配列が確認さ
れた個体（ヘテロ接合体）を選別しH-PGDS遺伝子欠損マウスを作製した。

実施例1

20 遺伝性脱髄疾患における造血器型プロスタグランジンD合成酵素とDP受容体の 誘導

Galactosylceramidase欠損症であるヒトKrabbe病
のモデルマウスTwitcher (Kobayashi T, et al., Brain Res.,
202:479-483, 1980; Duchon LW, et al., Brain, 103:695-710, 1980; Sakai N,
25 et al., J. Neurochem., 66:1118-1124, 1996; Taniike M. et al., J.
Neuropathol. Exp. Neurol., 58:644-653, 1999) を用いて、遺伝性の脱髄によ
る脳損傷に伴うH-PGDSとDP受容体のmRNAの変化を、定量的RT-PCR
法により定量した（図1参照）。H-PGDSとDP受容体のmRNAの発
現量は、共に、脱髄による脳損傷に伴い増加する。

免疫組織染色法により、H-PGDSはミクログリア細胞と脱髓の進んだ組織局所に集積するAmeboi d細胞やマクロファージ細胞に発現することを同定した(図2参照)。一方、DP受容体は、脱髓の進んだ組織の周辺に分布する活性化されたアストログリア細胞に発現することを同定した(図3参照)。

5

実施例2

自己免疫性脱髓疾患における造血器型プロスタグランジンD合成酵素とDP受容体の誘導

ヒト多発性硬化症のモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎マウス (Ichikawa M., et al., Cell Immunol., 191:97-104, 1999; Bernhard Hemmer, et al., Nature Review Neuroscience, 3:291-301, 2002) においても、定量的R T-P CR法により測定したH-PGDSとDP受容体のmRNAの発現量は、共に、脱髓による脳損傷と相関した増加を示す(図4参照)。

免疫組織染色法による観察では、H-PGDSはミクログリア細胞と脱髓の進んだ組織局所に集積するAmeboi d細胞やマクロファージ細胞に発現する(図5参照)。

15

実施例3

外傷性脳損傷における造血器型プロスタグランジンD合成酵素とDP受容体の誘導

20

外傷性大脳皮質傷害 (S t a b w o u n d) モデル (Salhia B, et al., Brain Res., 888:87-97, 2000; Asahi M., et al., J. Neurosci., 21:7724-7732, 2001; Garcia de Yebenes E., et al., J. Neurochem., 73:812-820, 1999) を用いて、脳損傷におけるH-PGDSとDP受容体のmRNAの発現を調べた結果、H-PGDSは損傷後2日目に最大値をとり(図6参照)、DP受容体は2日目から8日目にかけて持続的に増加した(図7参照)。

25

損傷の24時間後から傷害部位周囲に集積するミクログリア細胞とマクロファージでH-PGDSの誘導が起こり(図8と図9参照)、傷害部位周辺のアストログリア細胞ではGFAPとDP受容体の発現が増強し、これらの現象は損傷の

8日後まで持続した（図10と図11参照）。

傷害の程度を損傷部位への色素（エバンスブルー）の漏出反応（Kakimura Y, et al., Nature Medicine, 4:1078-1080, 1998）によって定量化した。損傷後2日目に最大値をとりその後治癒に伴って低下した（図20参照）。

5

実施例4

造血器型プロスタグランジンD合成酵素阻害剤投与による遺伝性脱髄疾患におけるアストログリア細胞の活性化の抑制

10 Twitcherマウスに、H-PGDS阻害剤であるHQL-79（4-ベンズヒドリルオキシ-1-（3-（1H-テトラゾール-5-イル）-プロピル）ピペリジン）を30mg/kg/日の用量で、14日間、皮下投与すると、アストログリア細胞の活性化が抑制され、同時に、アストログリア細胞でのDP受容体の発現が低下した（図13参照）。

15

実施例5

造血器型プロスタグランジンD合成酵素阻害剤投与による外傷性脳損傷におけるDP受容体の誘導の抑制と脳損傷の回復促進

20 H-PGDS阻害剤であるHQL-79を30mg/kg/日の用量で、傷害を与える1時間前から4日間、マウスに経口投与すると、Stab woundモデルにおける組織損傷領域でのDP受容体mRNA量は低下し（図14参照）、脳損傷の回復促進が認められた（図15参照）。この治療効果は傷害部位への色素漏出反応を指標とした実験によっても確認された（図21参照）。

さらに、傷害を与えた後からH-PGDS阻害剤の投与を開始しても損傷の拡大を抑制することが確認された（図22、23参照）。

25

実施例6

プロスタグランジンD受容体拮抗薬投与による外傷性脳損傷の軽減

Stab woundモデルマウスに、DP受容体拮抗薬であるBW A868C（（±）-3-ベンジル-5-（6-カルボキシヘキシル）-1-

(2-シクロヘキシル-2-ヒドロキシエチルアミノ) ヒダントインを損傷の当日から1 mg/kg/日の用量で4日間、静脈内投与すると脳損傷の回復促進が認められ、組織損傷部位周辺のアストログリアの活性化が抑制された(図16参照)。

- 5 Stab woundモデルマウスに対するプロスタグランジンD受容体拮抗薬であるBW A868Cあるいはラマトロバン(+)-(3R)-3-(4-フルオロベンゼンスルホンアミド)-1, 2, 3, 4-テトラヒドロカルボ-
10 ール-9-プロピオン酸)の効果を損傷部位への色素漏出量を指標に評価した。すなわち、脳損傷惹起2日後にエバンスブルー色素を静脈内投与し、その後2時間
10 間の組織への色素漏出量を測定した。BW A868C(1mg/kg)を脳損傷惹起3時間後および1日後に静脈内投与すると傷害部位への色素漏出を抑制した(図27参照)。
15 ラマトロバン(30mg/kg)を惹起3時間後および1日後に経口投与すると傷害部位への色素漏出を抑制した(図27参照)。

15

実施例7

- 20 Stab woundモデルに対するDP受容体拮抗薬であるピナグラジンの効果を損傷部位への色素漏出量で評価した。すなわち、脳損傷惹起2日後にエバンスブルー色素を静注し、その後2時間における色素の組織中漏出量を測定した。その結果、ピナグラジン(10mg/kg)を脳損傷惹起1時間前および1
20 日後に経口投与すると、脳損傷に伴って認められるエバンスブルー色素漏出量の増加が抑制された。またピナグラジン(10mg/kg)は惹起3時間および1
25 日後の後処置によっても色素の漏出を抑制した(図24参照)。さらに病理組織学的検討においてピナグラジンはいずれの投与方法によってもStab wound
25 モデルにおける脳損傷の進展を抑制した(図25参照)。

実施例8

ヒト造血器型プロスタグランジンD合成酵素大量発現による外傷性脳損傷の増悪
製造例1で作成したヒトH-PGDS大量発現トランスジェニックマウスを用

いた *Stab wound* モデルでは、損傷部位でのマクロファージの集積、および、抗 GFAP 抗体を用いて免疫組織化学的に調べたアストログリア細胞の活性化が、野生型マウスに比べて顕著であり治癒は遅延した（図 12 参照）。

5 実施例 9

造血器型プロスタグランジン D 合成酵素遺伝子欠損による外傷性脳損傷の軽減

製造例 2 で作製した造血器型プロスタグランジン D 合成酵素遺伝子欠損（HP GDS KO）マウス（ホモ接合体）を用いた *Stab wound* モデルでは、損傷部位での出血、抗 GFAP 抗体を用いて免疫組織化学的に調べたア
10 ストログリアの活性化が、さらに傷害部位での色素漏出が野生型マウスに比べて軽微であった（図 17 および図 26 参照）。

一方、DP 受容体遺伝子欠損（DPR KO）マウス（Matsuoka T, et al., Science, 17;287(5460):2013-2017, 2000）を用いた *Stab wound* モデルでは傷害部位での色素漏出が野生型マウスに比べて軽微であった（図 26 参
15 照）。

本発明に係る造血器型プロスタグランジン D 合成酵素（H-PGDS）阻害剤および／またはプロスタグランジン D 受容体の拮抗薬を治療に用いるには、通常の経口又は非経口投与用の製剤として製剤化する。本発明に係る造血器型プロスタ
20 グランジン D 合成酵素（H-PGDS）阻害剤および／またはプロスタグランジン D 受容体の拮抗薬を含有する医薬組成物は、経口及び非経口投与のための剤形をとることができる。即ち、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤などの経口投与製剤、あるいは、静脈注射、筋肉注射、皮下注射などの注射用溶液又は懸濁液、吸入薬、点眼薬、点鼻薬、坐剤、もしくは軟膏剤、貼布剤、パップ
25 剤などの経皮投与用製剤、経皮吸収剤などの非経口製剤とすることもできる。好ましくは、経口剤または注射用薬剤として用いる。

これらの製剤は当業者既知の適当な担体、賦形剤、溶媒、基剤等を用いて製造することができる。例えば、錠剤の場合、活性成分と補助成分を一緒に圧縮又は成型する。補助成分としては、製剤的に許容される賦形剤、例えば結合剤（例、

トウモロコシでん粉)、充填剤(例、ラクトース、微結晶性セルロース)、崩壊剤(例、でん粉グリコール酸ナトリウム)又は滑沢剤(例、ステアリン酸マグネシウム)などが用いられる。錠剤は、適宜、コーティングしてもよい。シロップ剤、液剤、懸濁剤などの液体製剤の場合、例えば、懸濁化剤(例、メチルセルロース)、乳化剤(例、レシチン)、保存剤などを用いる。注射用製剤の場合、溶液、懸濁液又は油性もしくは水性乳濁液の形態のいずれでもよく、これらは懸濁安定剤又は分散剤などを含有していてもよい。軟膏剤、貼布剤、パップ剤などの経皮投与用製剤、経皮吸収剤の場合は、水性基剤(水、低級アルコール、ポリオール)または油性基剤(高級脂肪酸エステル類(イソプロピルミリステート)、親油性アルコール)を用いて製剤化する。

本発明に係る造血器型プロスタグランジンD合成酵素(H-PGDS)阻害剤および/またはプロスタグランジンD受容体の拮抗薬は、投与形態、患者の症状、年齢、体重、性別、あるいは併用される薬物(あるとすれば)などにより異なり、最終的には医師の判断に委ねられるが、経口投与の場合、体重1kgあたり、1日0.01~100mg、好ましくは0.01~50mg、より好ましくは0.01~30mg、非経口投与の場合、体重1kgあたり、1日0.001~100mg、好ましくは0.001~5mg、より好ましくは0.001~3mgを投与する。これを1~4回に分割して投与すればよい。

20 製剤例

製剤例 1

以下の成分を含有する錠剤を製造する：

	式(I)で表わされる化合物	10 mg
	乳糖	90 mg
25	微結晶セルロース	30 mg
	CMC-Na	15 mg
	ステアリン酸マグネシウム	5 mg
		150 mg

式(I)で表わされる化合物、乳糖、微結晶セルロース、CMC-Na(カル

ボキシメチルセルロース ナトリウム塩) を60メッシュのふるいに通し、混合する。混合末にステアリン酸マグネシウム混合し、製錠用混合末を得る。本混合末を直打し、150mgの錠剤を得る。

5 5 製剤例 2

活性成分50mgを含む懸濁剤は次のように製造する：

	式 (I) で表わされる化合物	50mg
	ナトリウムカルボキシメチルセルロース	50mg
	シロップ	1.25ml
10	安息香酸溶液	0.10ml
	香料	q. v.
	色素	q. v.
	精製水を加え合計	5ml

15 活性成分をNo. 45メッシュU. S. のふるいにかけて、ナトリウムカルボキシメチルセルロースおよびシロップと混合して滑らかなペーストにする。安息香酸溶液および香料を水の一部で希釈して加え、攪拌する。ついで水を十分量加えて必要な体積にする。

20 製剤例 3

静脈用製剤は次のように製造する：

式 (I) で表わされる化合物	100mg
飽和脂肪酸グリセリド	1000ml

上記成分の溶液は通常、1分間に1mlの速度で患者に静脈内投与される。

25 製剤例 4

常法により次の組成のゼラチン硬カプセル剤を調製した。

HQL-79	10mg
デンプン	50mg
ステアリン酸マグネシウム	10mg

製剤例 5

常法により次の組成の錠剤を調製した。

	HQ L-79	10mg
5	セルロース、微晶質	500mg
	二酸化ケイ素	10mg
	ステアリン酸マグネシウム	10mg

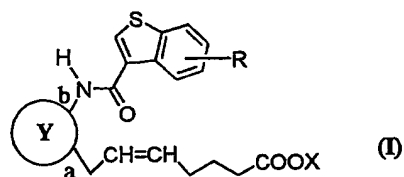
10 以上詳述したように、本発明の組成物は脳血管障害、脳変性疾患、脱髄疾患等の疾患の処置に使用できる。

脳損傷局所のミクログリア細胞やマクロファージで誘導されるH-PGDSを阻害したり、損傷部位の周辺のアストログリア細胞で発現するDP受容体の活性化を阻害することにより、プロスタグランジンD₂が関与する脳損傷を治療または予防することが可能となる。

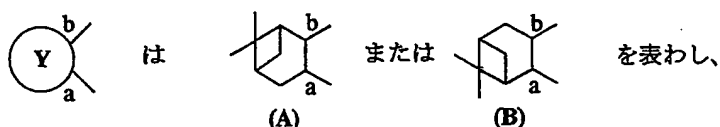
15 プロスタグランジンD₂は多発性硬化症患者で生合成が活発であり (Science 294:1731-11735, 2001)、そのモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎マウスの発症過程で増悪因子として働いている可能性が高いので、H-PGDSの特異的な阻害剤や受容体拮抗薬を用いると、現在行われているステロイド療法や免疫抑制剤に代わる、多発性硬化症の治療や予防にの有益な療法になりうる。さらにこれら
20 これらの薬剤は、自己免疫性の細胞障害や神経細胞死に伴う局所炎症反応を抑止することで、アルツハイマー病を含む神経原繊維変化を伴う難治疾患の治療にも応用できる。

請求の範囲

1. 造血器型プロスタグランジンD合成酵素 (H-PGDS) 阻害剤を活性成分として含む、脳損傷の治療または予防に用いる医薬組成物。
- 5 2. H-PGDS 阻害剤が4-ベンズヒドリルオキシ-1- {3- (1H-テトラゾール-5-イル) -プロピル} ピペリジン、1-アミノ-4- {4- [4-クロロ-6- (2-スルホ-フェニルアミノ) - [1, 3, 5] トリアジン-2-イルメチル] -3-スルホ-フェニルアミノ} -9, 10-ジオキソ-9, 10-ジヒドロ-アントラセン-2-スルホン酸、1-アミノ-4- (4-スル
10 ファモイルアニリノ) -アントラキノ-2-スルホン酸、もしくはそれらの製
薬上許容される塩またはそれらの水和物、または2- (2'-ベンゾチアゾリ
ル) -5-スチリル-3- (4'-フタルヒドラジディル) テトラゾリウム塩化
物またはその水和物である請求項1に記載の医薬組成物。
3. プロスタグランジンD受容体の拮抗薬を有効成分として含む、脳損傷の治
15 療または予防に用いる医薬組成物。
4. プロスタグランジンD受容体の拮抗薬が (±) -3-ベンジル-5-
 (6-カルボキシヘキシル) -1- (2-シクロヘキシル-2-ヒドロキシエチ
ルアミノ) -ヒダントイン、または (+) - (3R) -3- (4-フルオロベン
ゼンスルホンアミド) -1, 2, 3, 4-テトラヒドロカルバゾール-9-プロ
20 ピオン酸、(Z) -7- [(1R, 2R, 3S, 5S) -2- (5-ヒドロキシ
ベンゾ [b] チオフェン-3-イルカルボニルアミノ) -10-ノルピナン-
3-イル] ヘプター-5-エン酸、または (Z) -7- [(1R, 2R, 3S, 5
S) -2- (ベンゾ [b] チオフェン-3-イルカルボニルアミノ) -10-ノ
ルピナン-3-イル] ヘプター-5-エン酸、もしくはその製薬上許容される塩ま
25 たはそれらの水和物である請求項3に記載の医薬組成物。
5. プロスタグランジンD受容体の拮抗薬が、式 (I) :



(式中、

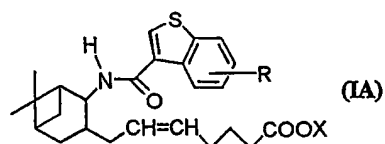


5 Rは水素、アルキル、アルコキシ、ハロゲン、ヒドロキシ、アシルオキシまたは置換されていてもよいアリールスルホニルオキシを表わし、Xは水素またはアルキルを表わし、 α 鎖の二重結合はE配置またはZ配置を表わす)

で示される化合物もしくはその製薬上許容される塩またはそれらの水和物である請求項 3 に記載の医薬組成物。

6. プロスタグランジンD受容体の拮抗薬が、式 (I A) :

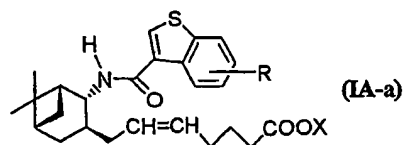
10



(式中、RおよびXは前記と同意義であり、 α 鎖の二重結合はE配置またはZ配置を表わす)

15 で示される化合物もしくはその製薬上許容される塩またはそれらの水和物である請求項 3 に記載の医薬組成物。

7. プロスタグランジンD受容体の拮抗薬が、式 (I A-a) :



(式中、RおよびXは前記と同意義であり、 α 鎖の二重結合はE配置またはZ配置を表わす)

20

で示される化合物もしくはその製薬上許容される塩またはそれらの水和物である請求項 3 に記載の医薬組成物。

8. 有効量の造血器型プロスタグランジンD合成酵素 (H-PGDS) 阻害剤を投与することを含む脳損傷の治療方法。

5 9. 脳損傷の治療用薬剤を製造するための、造血器型プロスタグランジンD合成酵素 (H-PGDS) 阻害剤の使用。

10 10. 有効量のプロスタグランジンD受容体の拮抗薬を投与することを含む脳損傷の治療方法。

11. 脳損傷の治療用薬剤を製造するための、プロスタグランジンD受容体の拮抗薬の使用。

12. 造血器型プロスタグランジンD合成酵素 (H-PGDS) 阻害剤およびプロスタグランジンD受容体の拮抗薬を活性成分として含む、脳損傷の治療または予防に用いる医薬組成物。

13. 1) ヒトH-PGDS大量発現トランスジェニックマウスの脳に外傷を与え、

2) 外傷を与える前又は後に候補化合物をトランスジェニックマウスに投与し、

3) 該マウスにおける外傷の状態を、候補化合物を与えないトランスジェニックマウスにおける状態と比較する、

ことを含む脳損傷の治療または予防に用いる化合物のスクリーニング方法。

図 1

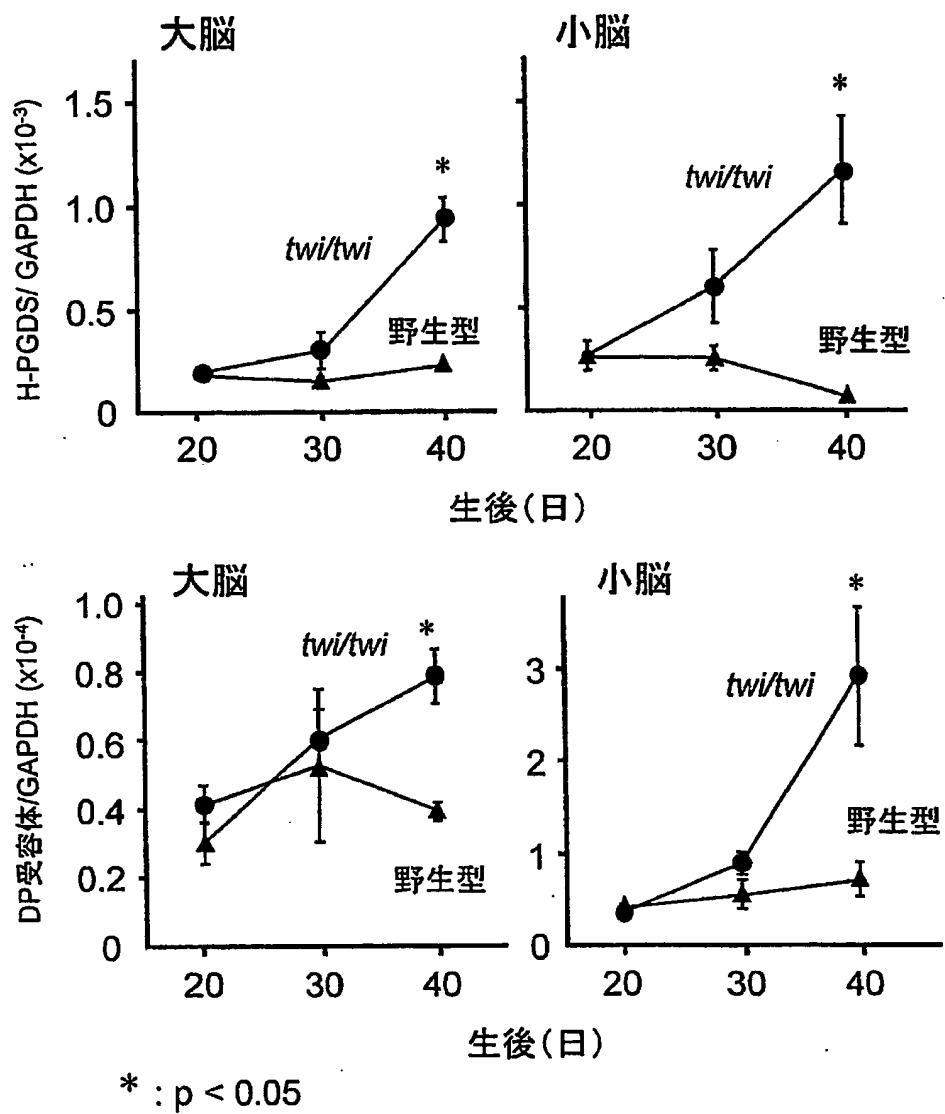


図 2

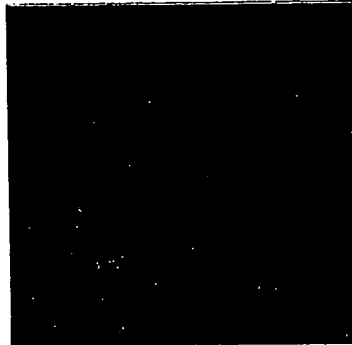


F4/80 : ミクログリア細胞特異的抗体による染色

RCA-1 : リシナスコムユナスアグルチニン-1レクチン

図3

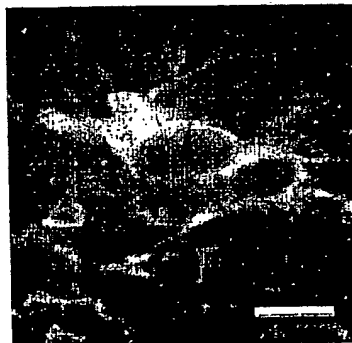
GFAP



DP受容体



マージ



GFAP : アストログリア特異的抗体による染色

4/26

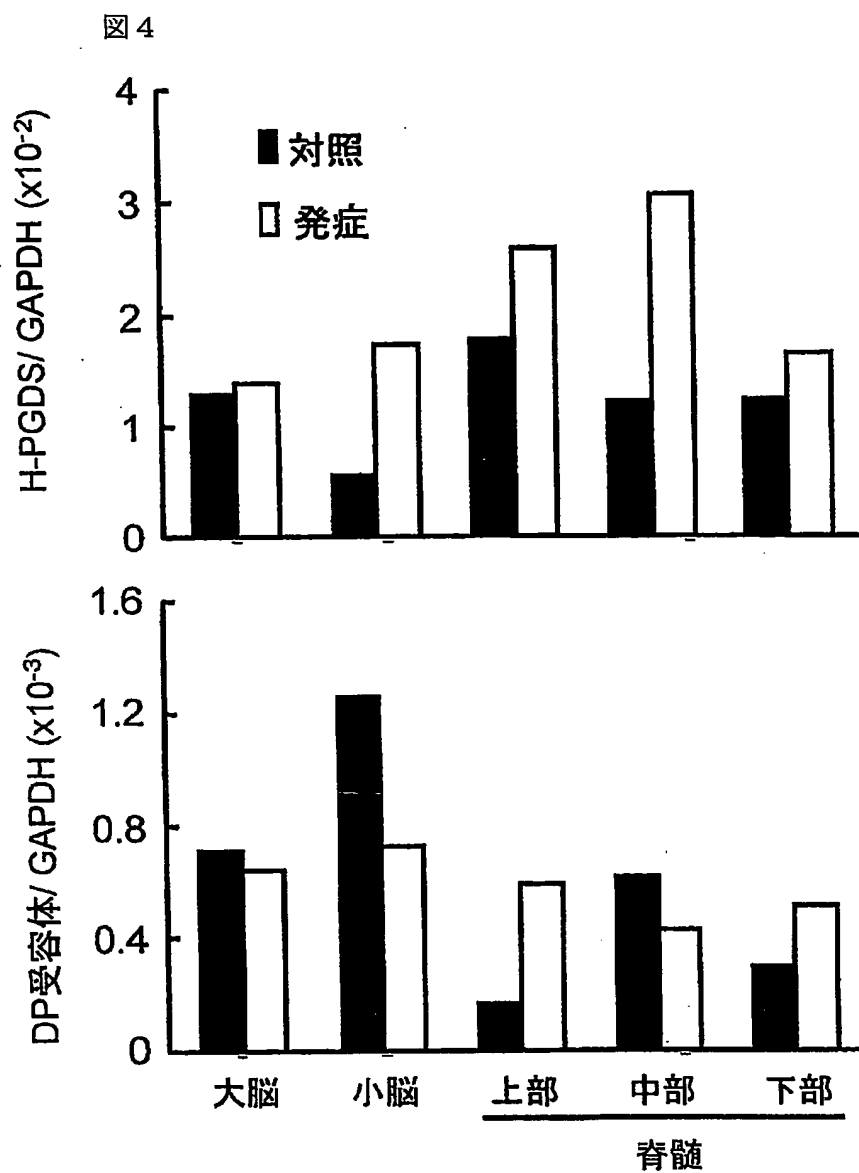
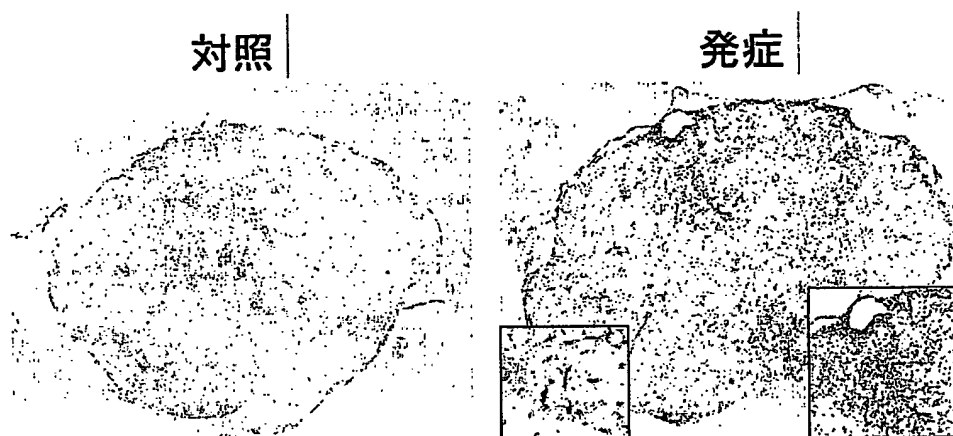
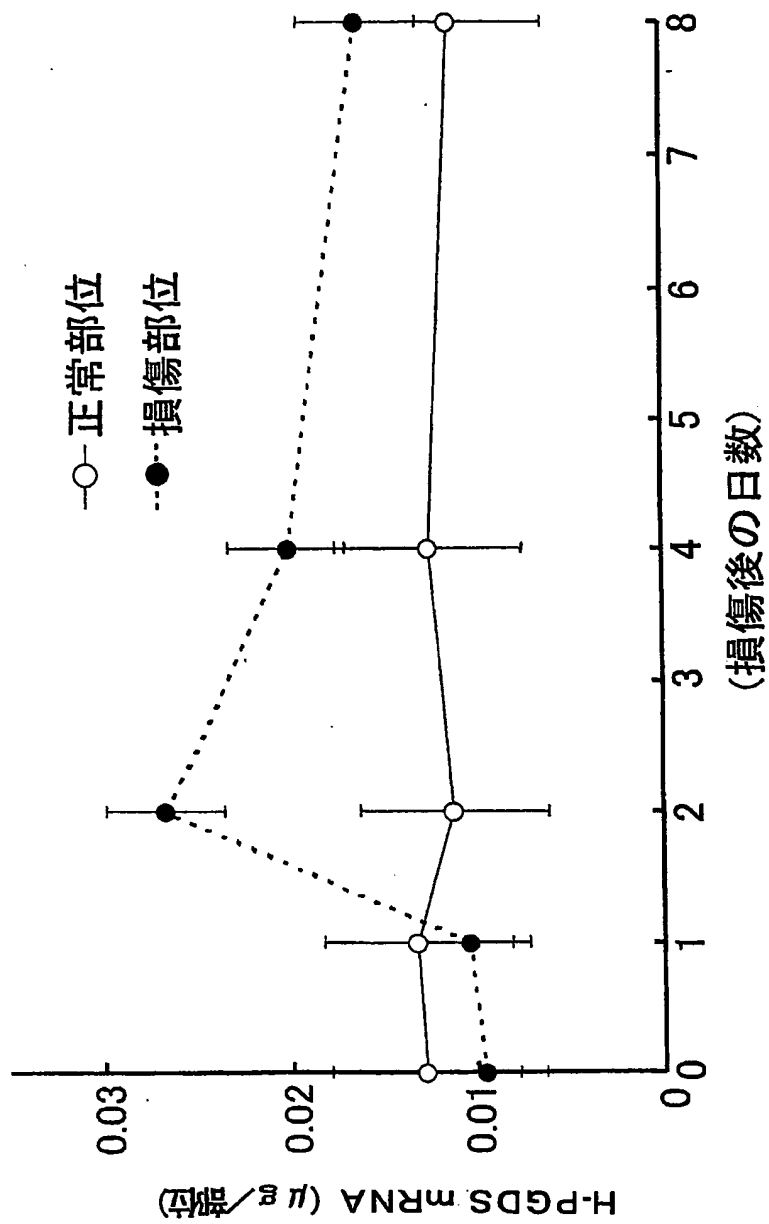


図 5

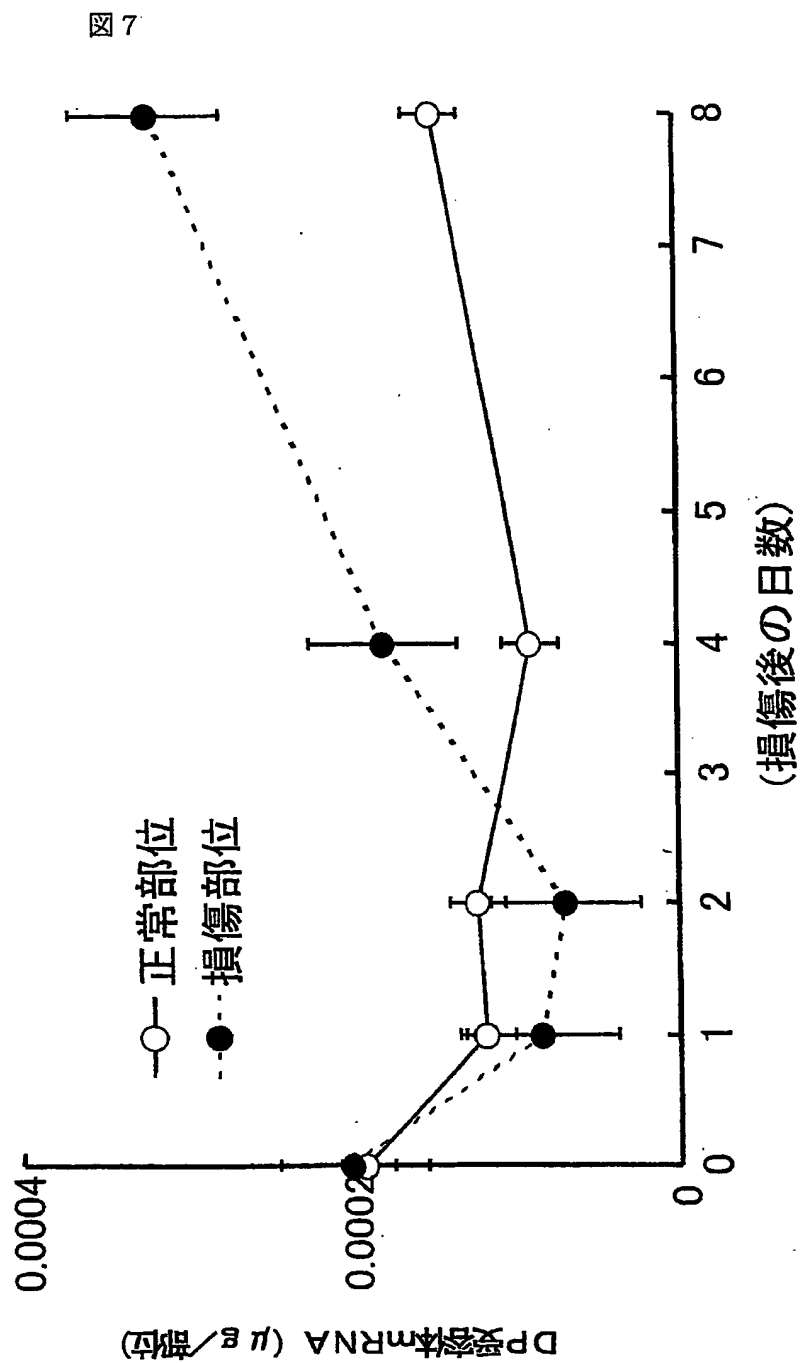


6/26

図 6

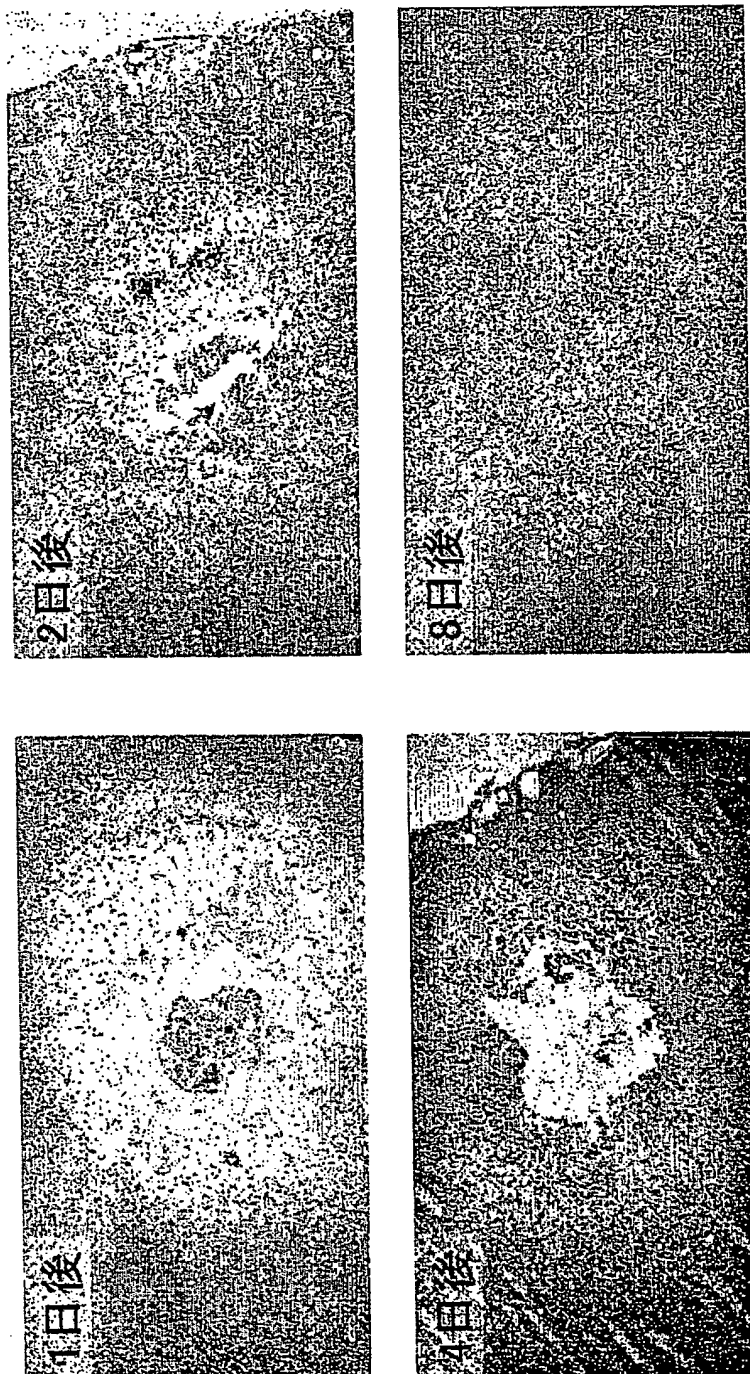


7/26



8/26

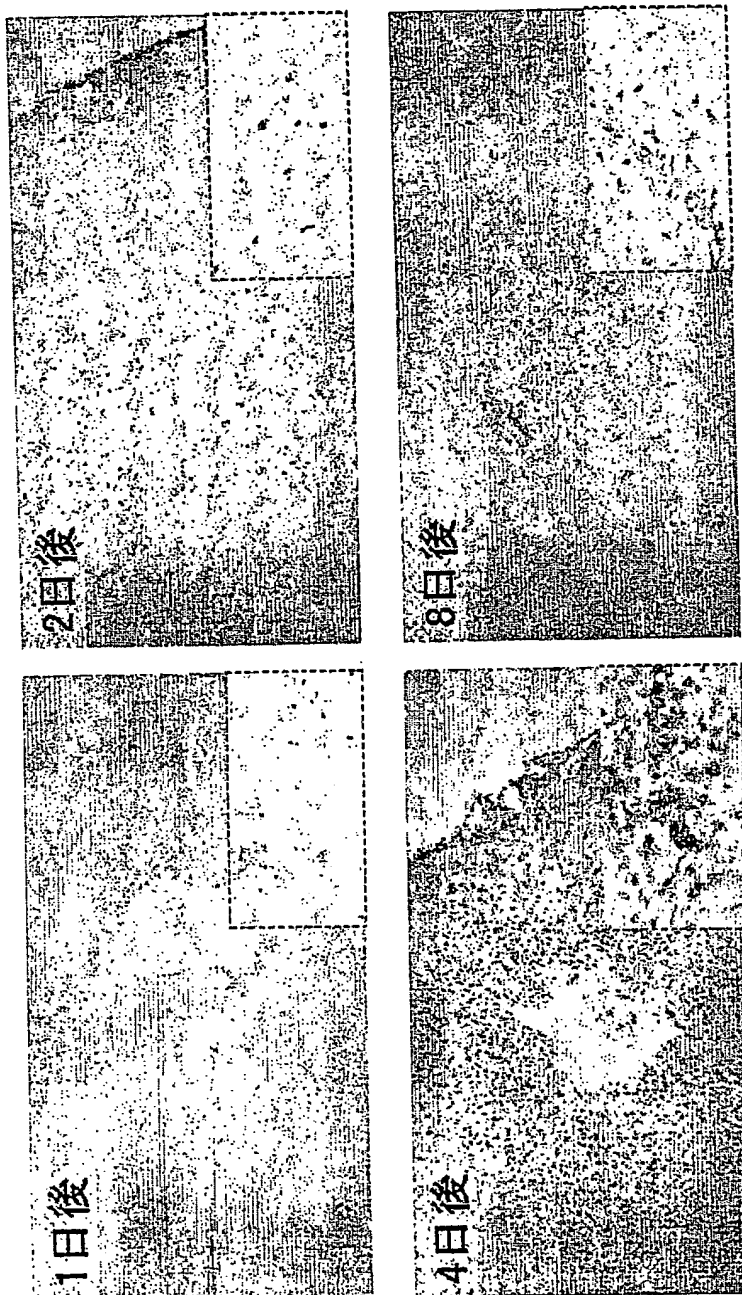
図 8



(ヘマトキシリン・エオジン 染色)

9/26

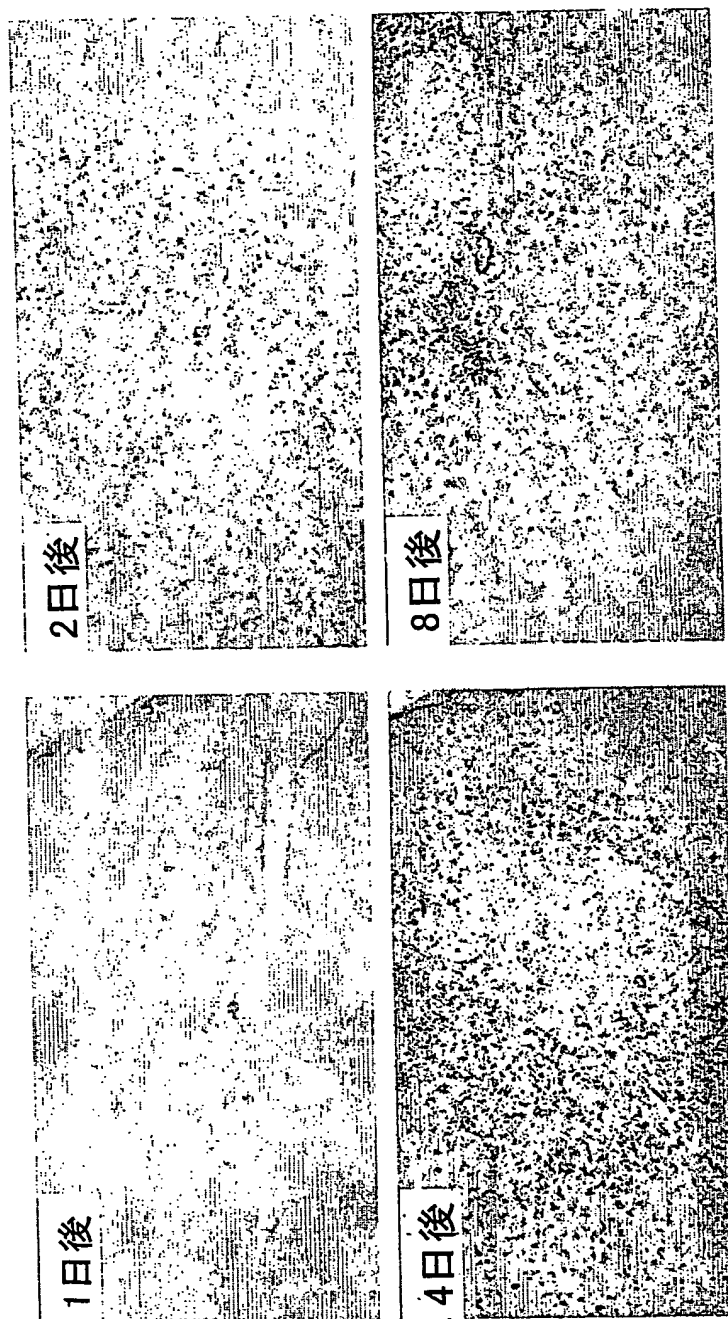
図 9



H-PGDS特異的抗体による染色

10/26

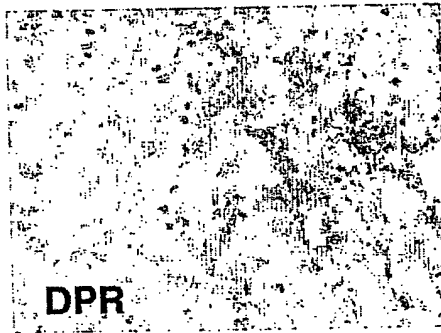
図 10



GFAP : アストログリア特異的抗体による染色

11/26

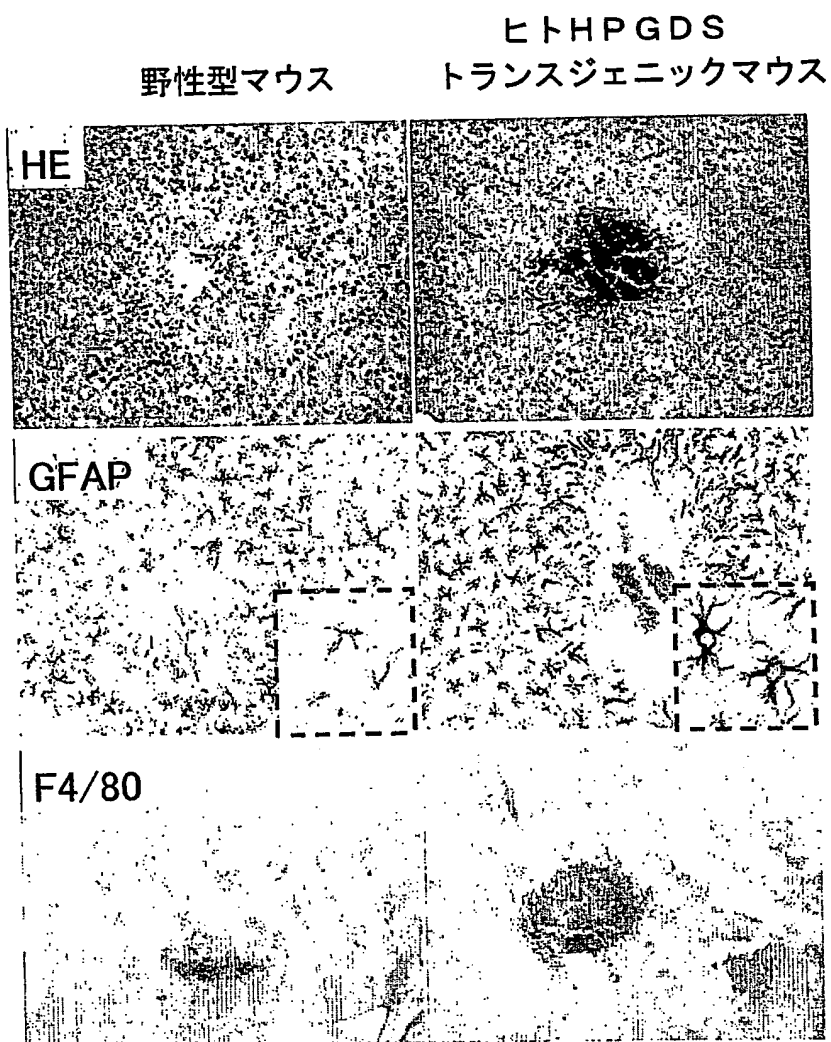
図 11



HE : ヘマトキシリン・エオジンによる染色
GFAP : アストログリア特異的抗体による染色
DPR : DP受容体特異的抗体による染色

12/26

図 1 2

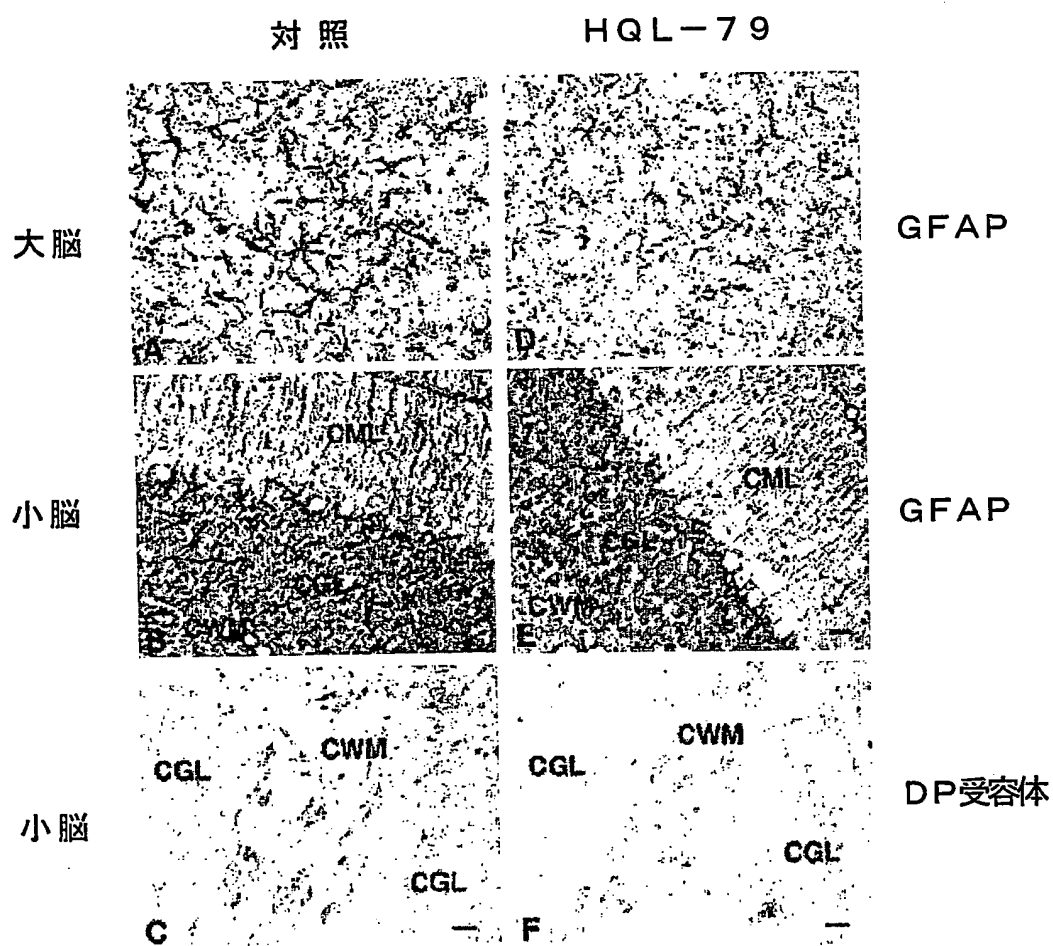


HE : ヘマトキシリン・エオジンによる染色

GFAP : アストログリア特異的抗体による染色

F4/80 : ミクログリア細胞特異的抗体による染色

図13



CML : 小脳分子層

CGL : 小脳顆粒層

CWM : 小脳白質

GFAP : アストログリア特異的抗体による染色

14/26

図 14

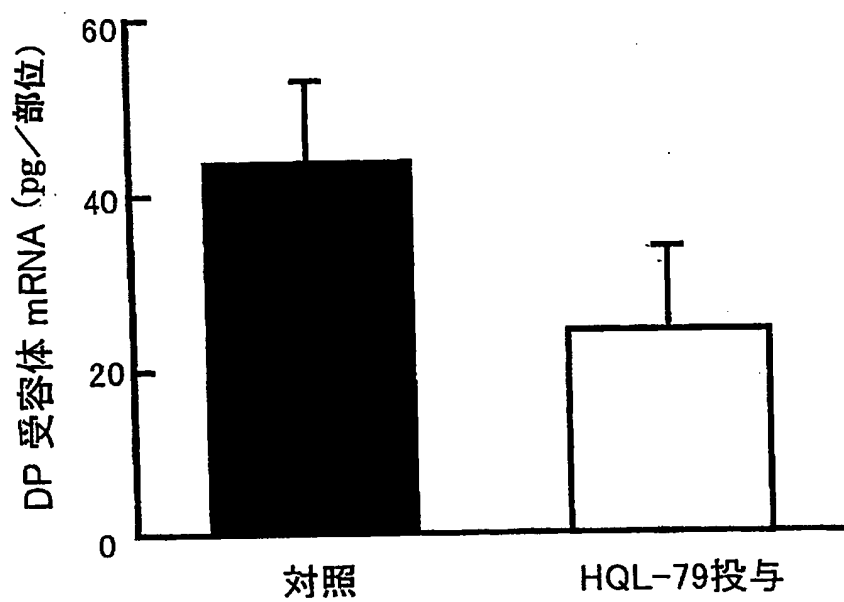
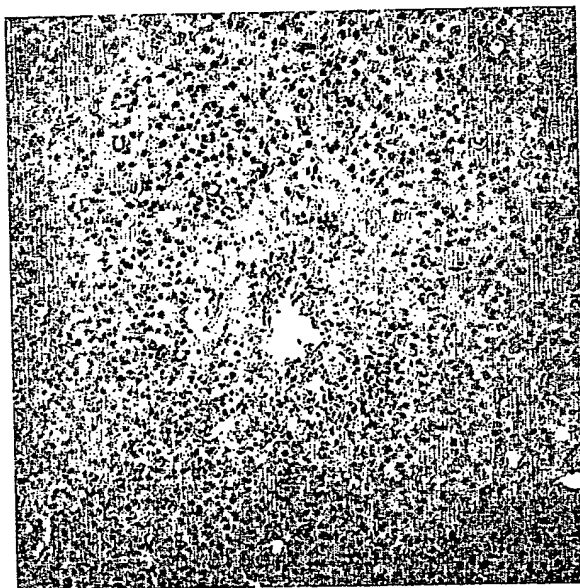


図 15

HQL-79 投与群



(ヘマトキシリン・エオジン染色)

対照

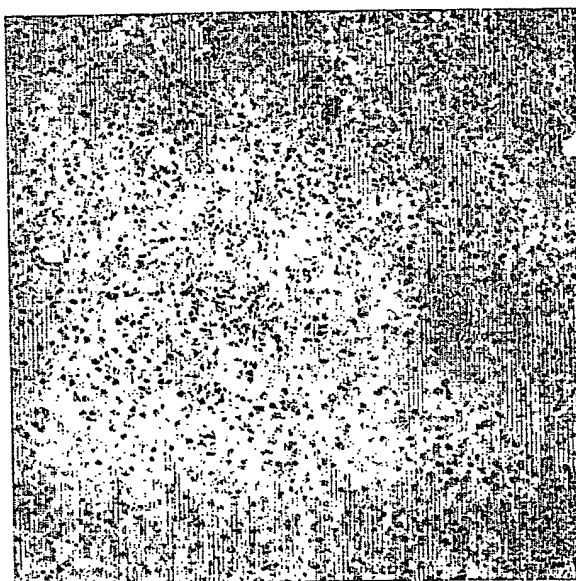
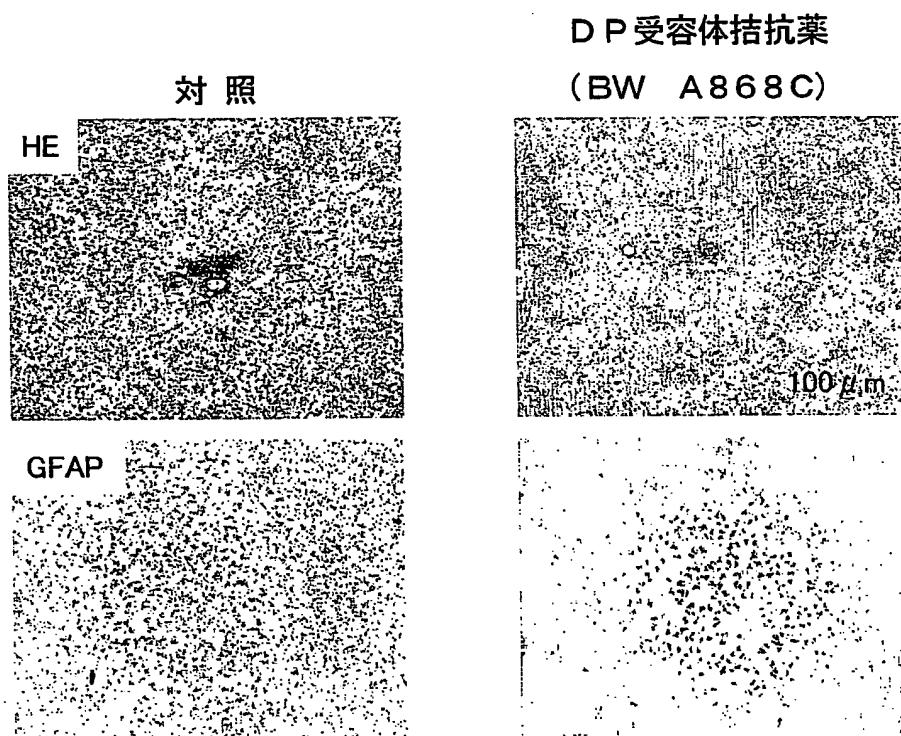


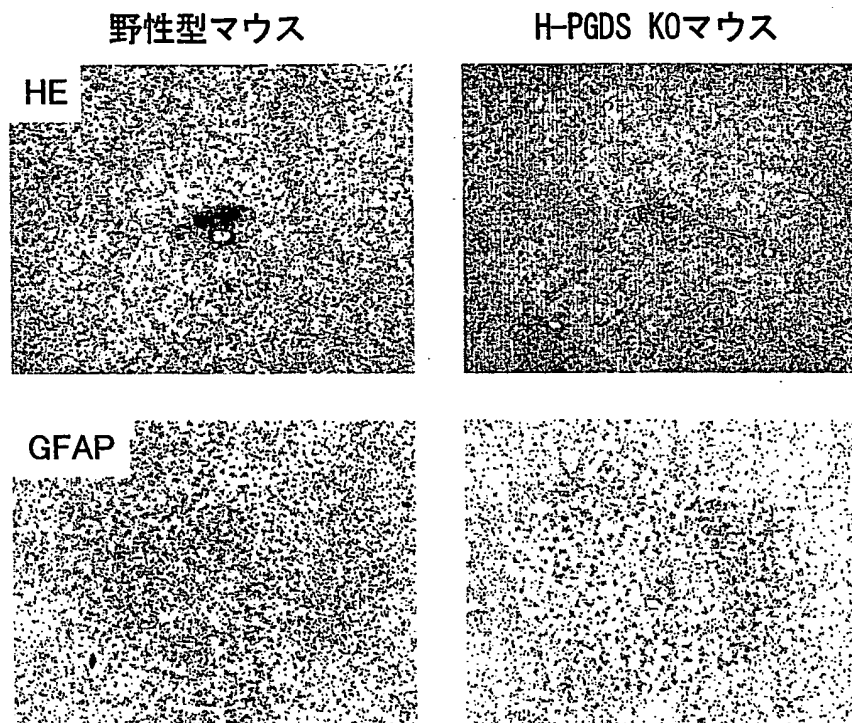
図 16



HE : ヘマトキシリン・エオジンによる染色

GFAP : アストログリア特異的抗体による染色

図 17



HE : ヘマトキシリン・エオジンによる染色

GFAP : アストログリア特異的抗体による染色

18/26

図 18

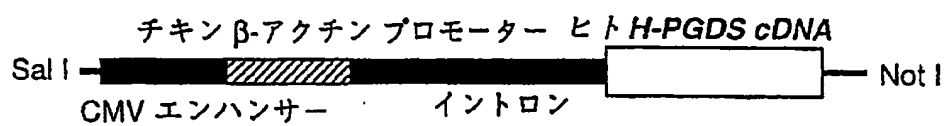
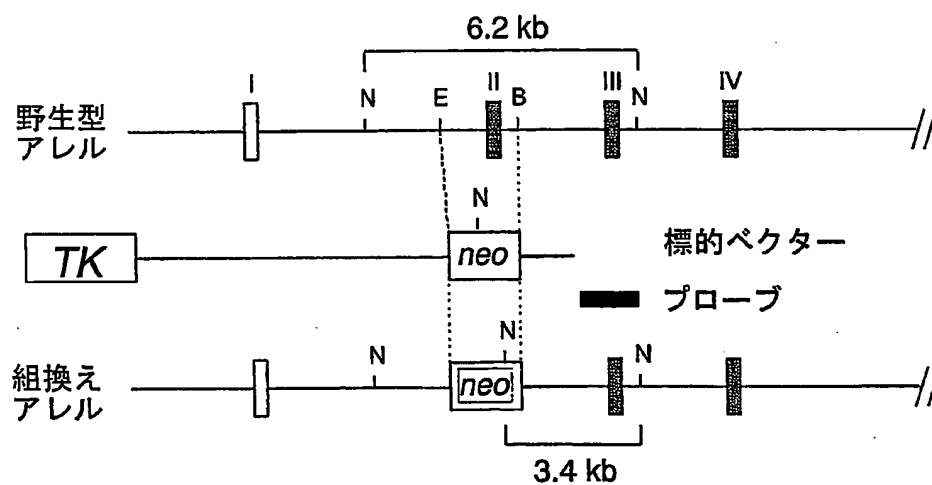
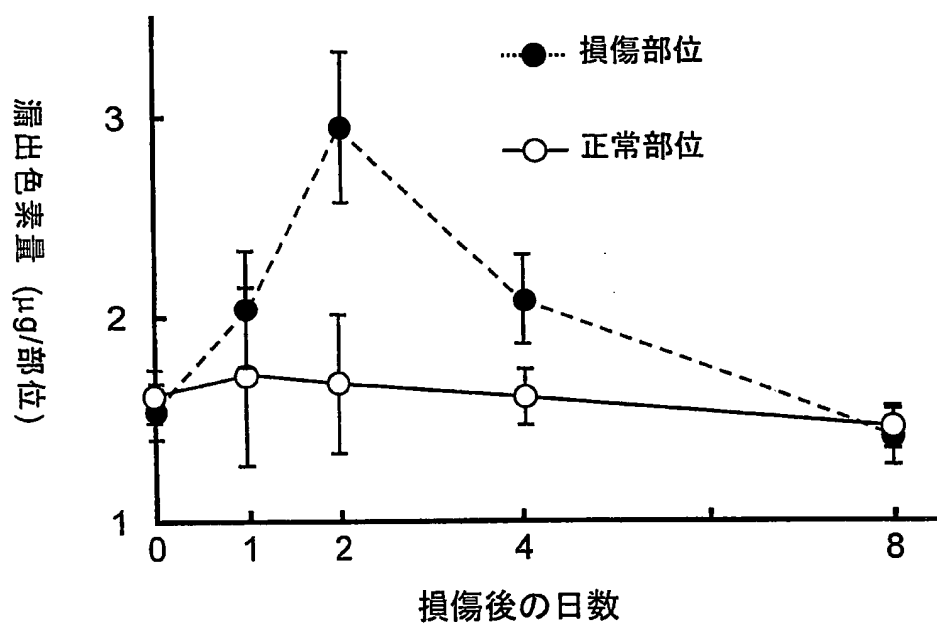


図 19



19/26

図 20



20/26

図 2 1

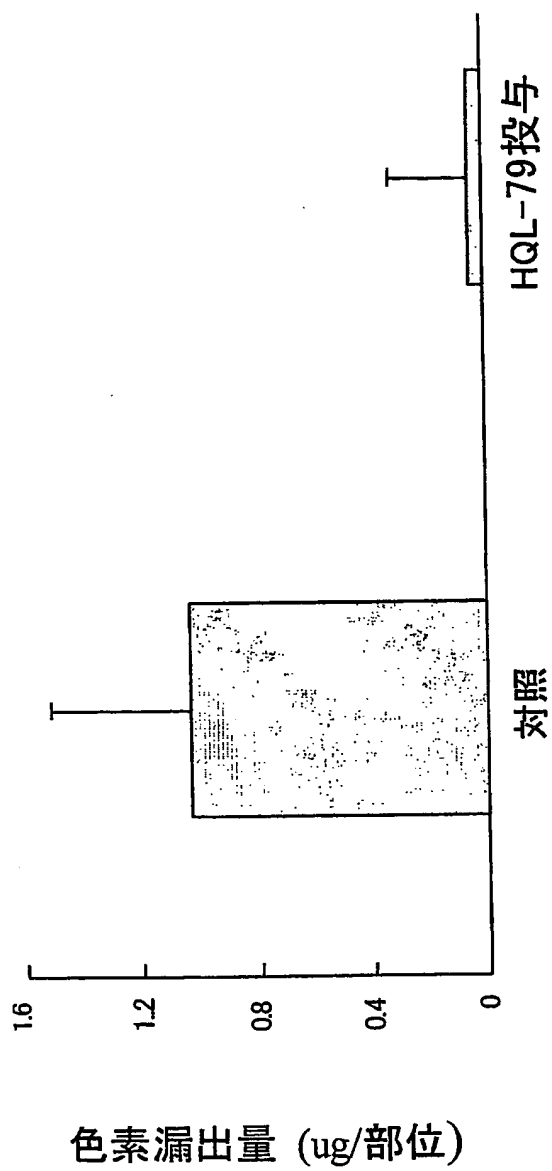
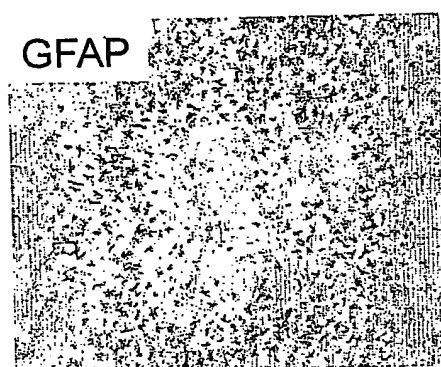
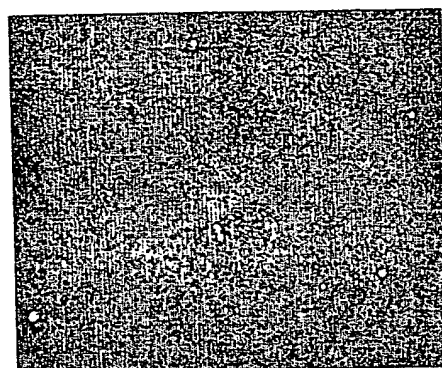
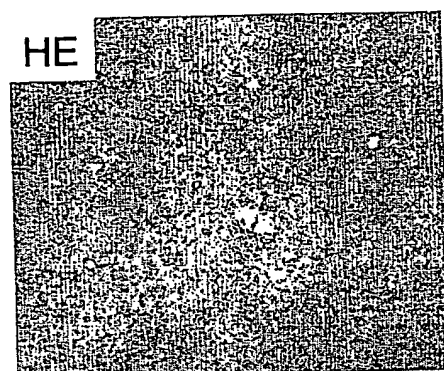


図 2 2

対照

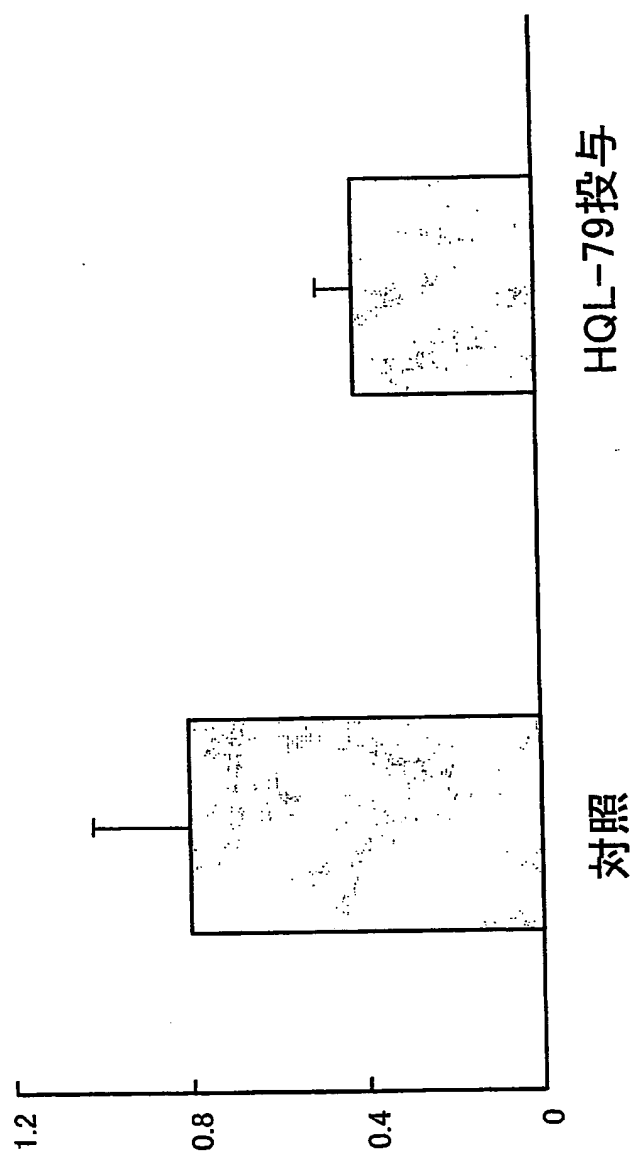
HQL-79投与群



HE : ヘマトキシリン・エオジン染色

GFAP : アストログリア特異的抗体による染色

図 23



色素漏出量 ($\mu\text{g}/\text{部位}$)

図 2 4

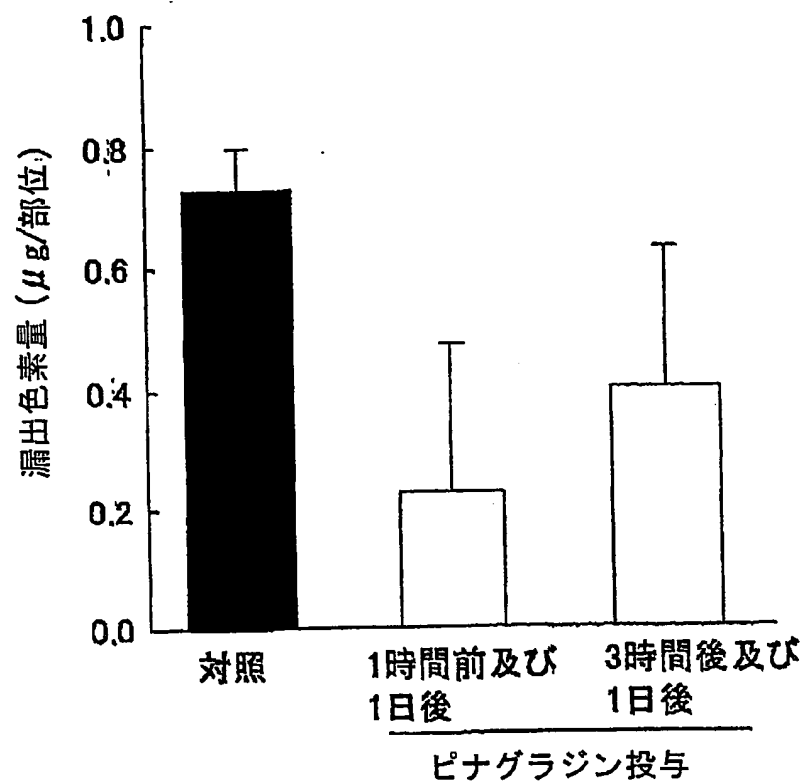
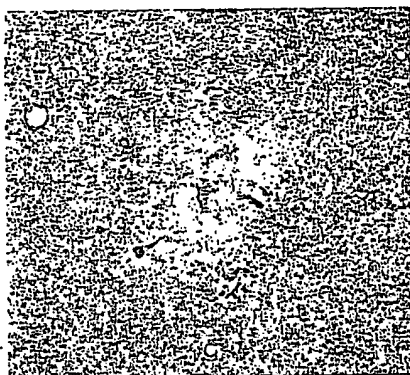


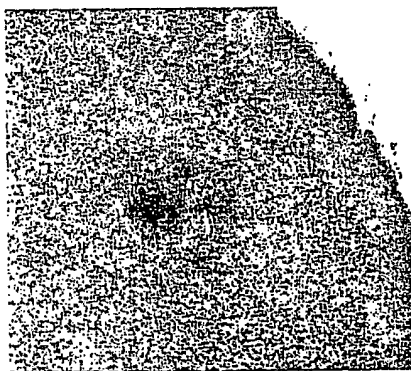
図 2 5

対照

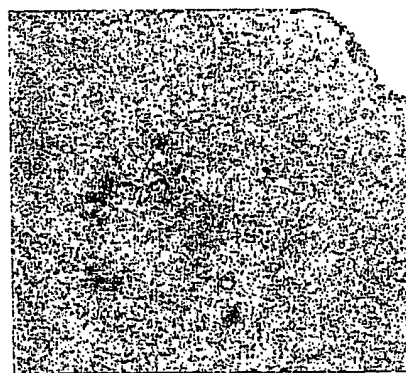


ピナグラジン投与

1時間前及び1日後



3時間後及び1日後



(ヘマトキシリン・エオジン染色)

図 26

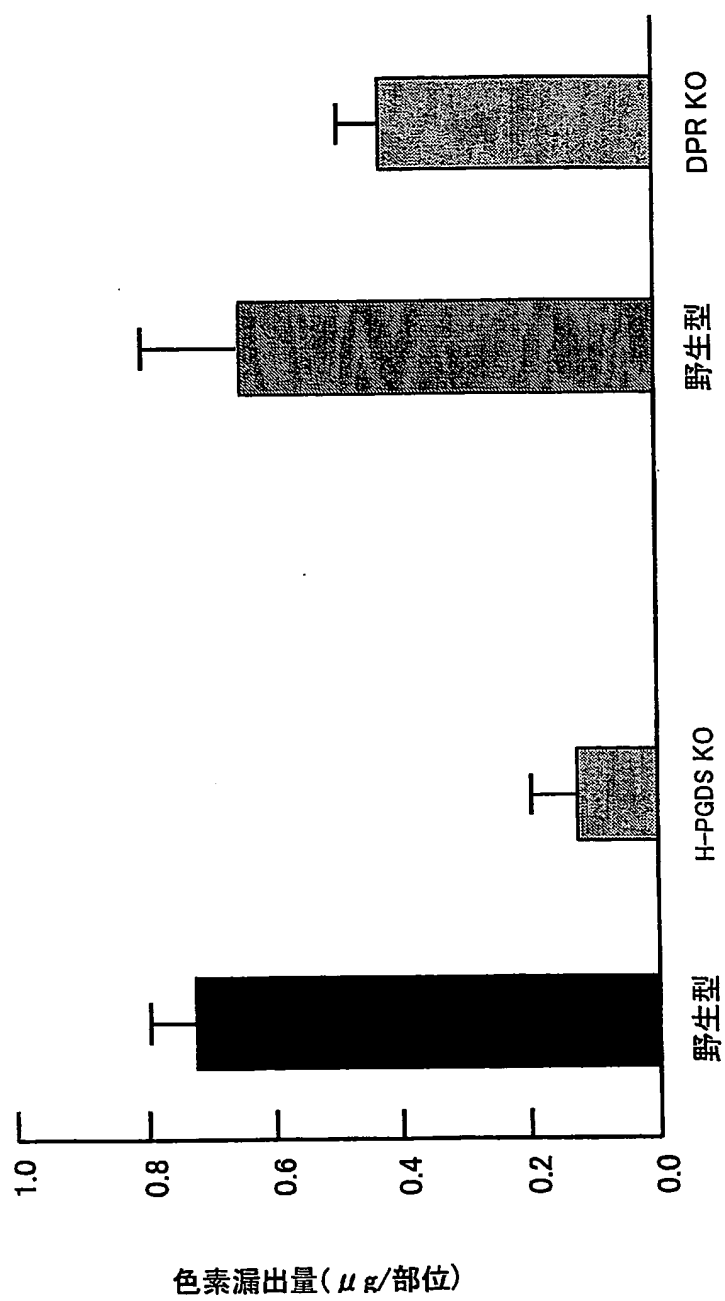
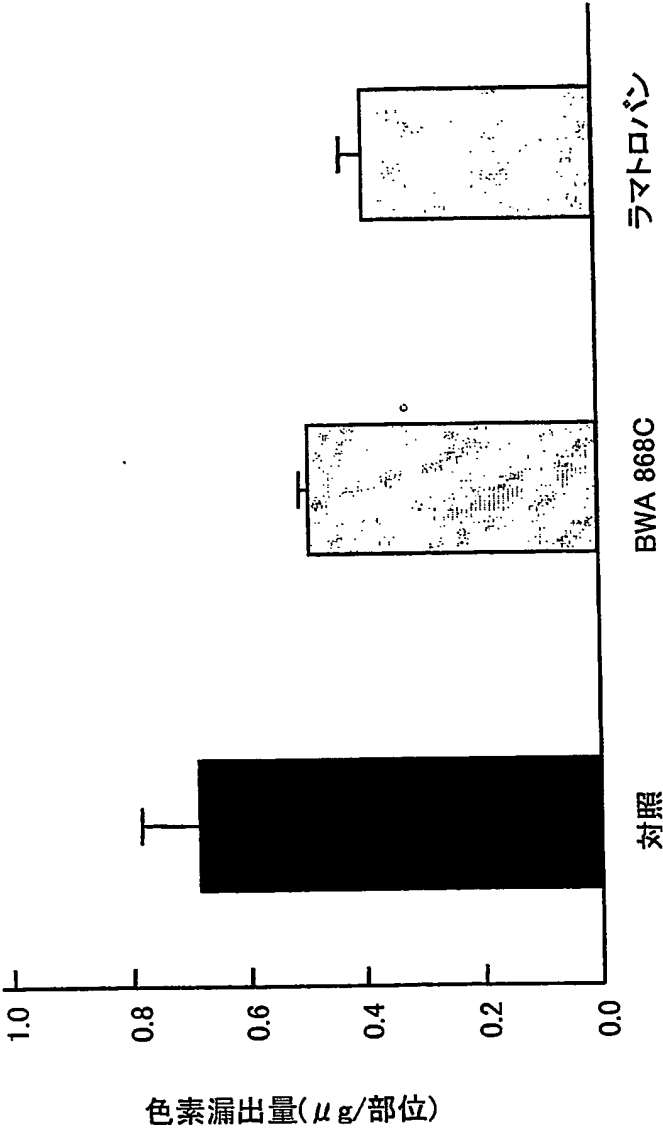


図 27



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/08904

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K45/00, 31/454, 31/53, 31/381, A61P25/00, 43/00//
C07D401/06, C07D333/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K45/00, 31/454, 31/53, 31/381, A61P25/00, 43/00//
C07D401/06, C07D333/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2001-220354 A (Maruha Corp., Osaka Bioscience Institute, Japan Science and Technology Corp.), 14 August, 2001 (14.08.01), (Family: none)	1-7, 9, 11, 12
A	EP 1186303 A2 (Pfizer Products Inc.), 13 March, 2002 (13.03.02), & US 2002/0045656 A1 & JP 2002-322095 A	1-7, 9, 11, 12
A	WO 01/14377 A1 (Biogen Inc.), 21 June, 2001 (21.06.01), & EP 1242118 A1 & US 2002/0197233 A1 & JP 2003-517023 A	1-7, 9, 11, 12
A	WO 97/44031 A1 (Bayer Yakuhin, Ltd.), 27 November, 1997 (27.11.97), & JP 2002-241282 A	1-7, 9, 11, 12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
09 October, 2003 (09.10.03)

Date of mailing of the international search report
28 October, 2003 (28.10.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/08904

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 11-116477 A (Bayer Yakuhin, Ltd.), 27 April, 1999 (27.04.99), (Family: none)	1-7, 9, 11, 12
A	WO 00/53573 A1 (Shionogi & Co., Ltd.), 14 September, 2000 (14.09.00), & EP 1176139 A1	1-7, 9, 11, 12
A	Nobutoshi MATSUSHITA, "Prostaglandin D Gosei Koso Sogaiyaku Allergy-sei Zensoku Chiryoyaku to Shite no Kanosei", Protein, Nucleic acid and Enzyme, 2000, Vol.45, No.6, pages 1072 to 1076	1-7, 9, 11, 12
A	Yu J. Liu et al., Effects of BW A868C, a selective prostaglandin DP receptor antagonist, in dog isolated vascular preparations, European Journal of Pharmacology, 1996, Vol.303, No.3, pages 187 to 192	1-7, 9, 11, 12
A	JP 2001-103869 A (Japan Science and Technology Corp., Osaka Bioscience Institute, Oriental Yeast Co., Ltd.), 17 April, 2001 (17.04.01), (Family: none)	13
A	WO 01/24627 A1 (Japan Science and Technology Corp., Osaka Bioscience Institute, Oriental Yeast Co., Ltd.), 12 April, 2001 (12.04.01), & EP 1224861 A1 & JP 2001-527641 A	13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/08904

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 8, 10

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 8 and 10 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions according to claims 1, 2, 9 and 12 relate to a medicinal composition to be used in treating or preventing brain injury which contains as the active ingredient a hematopoietic prostaglandin D synthase (H-PGDS) inhibitor. In contrast, the inventions according to claims 3 to 7 and 11 relate to a medicinal composition to be used in treating or preventing brain injury which contains as the active ingredient a prostaglandin D receptor antagonist. Further, the invention according to claim 13 relates to a method of screening a compound to be used in treating or preventing brain injury.

However, the hematopoietic prostaglandin D synthase (H-PGDS) inhibitor differs in pharmacological activity and compounds (continued to extra sheet)

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/08904

Continuation of Box No. II of continuation of first sheet(1)

specifically involved therein from the prostaglandin D receptor antagonist. On the other hand, the method of screening a compound to be used in treating or preventing brain injury cannot be regarded as being a method specifically applied to the production of a medicinal composition to be used in treating or preventing brain injury. Namely, there is no common matter which is considered as a special technical feature in accordance with the second sentence of PCT Rule 13.2 and thus no technical relevancy according to PCT Rule 13 can be found among these inventions differing from each other.

Such being the case, it does not appear that there is a technical relationship between these groups of inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features. Thus, these groups of inventions are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ A61K45/00, 31/454, 31/53, 31/381, A61P25/00, 43/00 // C07D401/06, C07D333/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ A61K45/00, 31/454, 31/53, 31/381, A61P25/00, 43/00 // C07D401/06, C07D333/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 2001-220354 A (マルハ株式会社, 財団法人大阪バイオサイエンス研究所, 科学技術振興事業団), 2001. 08. 14 (ファミリーなし)	1-7, 9, 11, 12
A	EP 1186303 A2 (ファイザー・プロダクツ・インク), 2002. 03. 13 & US 2002/004565 6 A1 & JP 2002-322095 A	1-7, 9, 11, 12
A	WO 01/14377 A1 (バイオジェン インコーポレイテッド), 2001. 06. 21 & EP 1242118 A1	1-7, 9, 11, 12

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09. 10. 03

国際調査報告の発送日

28.10.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 のぶよ



4C

9454

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	& US 2002/0197233 A1 & JP 2003-517023 A	
A	WO 97/44031 A1 (バイエル薬品株式会社), 1997. 11. 27 & JP 2002-241282 A	1-7, 9, 11, 12
A	JP 11-116477 A (バイエル薬品株式会社), 1999. 04. 27 (ファミリーなし)	1-7, 9, 11, 12
A	WO 00/53573 A1 (塩野義製薬株式会社), 2000. 09. 14 & EP 1176139 A1	1-7, 9, 11, 12
A	松下信利, プロスタグランジンD合成酵素阻害薬 アレルギー性喘息治療薬としての可能性, 蛋白質 核酸 酵素, 2000, Vol. 45, No. 6, p. 1072-1076	1-7, 9, 11, 12
A	Yu J. Liu et al., Effects of BW A868C, a selective prostaglandin DP receptor antagonist, in dog isolated vascular preparations, European Journal of Pharmacology, 1996, Vol. 303, No.3, p.187-192	1-7, 9, 11, 12
A	JP 2001-103869 A (科学技術振興事業団, 財団法人大阪バイオサイエンス研究所, オリエンタル酵母工業株式会社), 2001. 04. 17 (ファミリーなし)	13
A	WO 01/24627 A1 (科学技術振興事業団, 財団法人大阪バイオサイエンス研究所, オリエンタル酵母工業株式会社), 2001. 04. 12 & EP 1224861 A1 & JP 2001-527641 A	13

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 8, 10 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲 8, 10 は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i) 及びPCT規則39.1(iv) の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a) の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求項1, 2, 9, 12に係る発明は、造血器型プロスタグランジンD合成酵素 (H-PGDS) 阻害剤を活性成分として含む、脳損傷の治療または予防に用いる医薬組成物であるのに対し、請求項3-7, 11に係る発明は、プロスタグランジンD受容体の拮抗薬を有効成分として含む、脳損傷の治療または予防に用いる医薬組成物であり、また、請求項13に係る発明は、脳損傷の治療または予防に用いる化合物のスクリーニング方法である。
しかしながら、造血器型プロスタグランジンD合成酵素 (H-PGDS) 阻害剤とプロスタグランジンD受容体の拮抗薬とは、その薬理活性や具体的に包含される化合物が異なり、また、脳損傷の治療または予防に用いる化合物のスクリーニング方法は、脳損傷の治療また
(続く)

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

（「第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見」の続き）

は予防に用いる医薬組成物の製造のために特に適用した方法とは認められないから、PCT規則13.2の第2文の意味において特別な技術的特徴と考えられる共通の事項が存在しないので、それらの相違する発明の間にPCT規則13の意味における技術的な関連を見いだすことはできない。

よって、これらの発明は、一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係にないから、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.